



Universidad de Salamanca
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica



Organización genómica del inicio
de la replicación y la recombinación
en *Schizosaccharomyces pombe*

Elisa de Castro Álvarez
2010

Portada: "Autumn Tree In Movement" Egon Schiele.
Cortesía de www.egon-schiele.net



D. Ángel Domínguez Olavarri, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Organización genómica del inicio de la replicación y la recombinación en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Elisa de Castro Álvarez para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC/Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a 16 de Diciembre de 2009.

Fdo. Ángel Domínguez Olavarri

D. Francisco Antequera Márquez, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Organización genómica del inicio de la replicación y la recombinación en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Elisa de Castro Álvarez para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Centro Mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC/Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca. Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el siguiente certificado en Salamanca, a 16 de Diciembre de 2009.

Fdo. Francisco Antequera Márquez



D. Francisco del Rey Iglesias, Catedrático del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Organización genómica del inicio de la replicación y la recombinación en *Schizosaccharomyces pombe*” presentada por la licenciada Dña. Elisa de Castro Álvarez para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francisco Antequera Márquez en el Centro Mixto Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC/Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide el siguiente certificado en Salamanca, a 16 de Diciembre de 2009.

Fdo. Francisco del Rey Iglesias

Esta tesis doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral del Programa de Formación del Profesorado Universitario (2004/2008) del Ministerio de Educación del Gobierno de España, proyectos del Plan Nacional de I+D y por el proyecto CONSOLIDER Ingenio 2010.

¿Sería demasiado osado imaginar que, con el paso del tiempo, desde que la tierra empezó a existir, quizá millones de eras antes del comienzo de la historia del género humano, sería demasiado osado imaginar que todos los animales de sangre caliente salieron de un filamento vivo..., provisto de la facultad de continuar mejorando merced a su propia actividad inherente y de transmitir esos mejoramientos de generación en generación a su posteridad, ¡un mundo sin fin!

ERASMUS DARWIN,
Zoonomía, 1794

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar gracias a Paco, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su proyecto de investigación y por la privilegiada formación que he recibido a lo largo de estos años, tanto científica como personal.

A Miguel Sánchez, Javi, Alberto y al resto del grupo MSP, por haberme ayudado a dar mis primeros pasos con tanta paciencia, ellos me enseñaron una nueva forma de trabajar y me contagiaron su fascinación por la ciencia.

Al personal técnico y administrativo del IMB, por tener siempre una palabra amable y una sonrisa y por su inestimable ayuda.

A todos los investigadores del IMB, por su compañerismo, por estar siempre disponibles y haberme dado tan buenos consejos. En especial a Sergio Rincón y a Paco Conde, también a Pedro, Esther, Jorge, Mario, Toñi, Virginia, Laura Andrés, Javi Muñoz, José Ángel, Marisa, Sara... y a muchos más.

A Cristina Martín y Arturo Calzada, por su valiosísima ayuda, sus consejos técnicos y sus discusiones científicas y por el interés que mostraron siempre por mi trabajo. Ellos han sido para mí un ejemplo, profesional y personal.

A Maria y Joana, por haber estado tan cerca, y porque tras su llegada sus puntos de vista ampliaron nuestra perspectiva del mundo científico. A Laura de Los Ríos y a Mónica por todo lo que me enseñaron y por seguir preocupándose por mí después de tantos años. A los nuevos, Nacho y Rebeca por haber entrado tan amigablemente a formar parte del equipo. A Martina, por su impagable ayuda durante los meses que estuvo con nosotros. A Laura Marín, Naza y Mar, por su cariño y porque han sido las mejores compañeras imaginables. Y a Celia, por haber hecho que estas últimas semanas hayan sido tan entrañables. A Laura Mojardín y a Cristina, a ellas les debo un porcentaje muy elevado de este trabajo, tanto por su constante e incondicional apoyo como por los momentos que vivimos juntas, que siempre recordaré con nostalgia.

A mi hermana Regina y a mis amigos, Juan, Marta A., Diana, Inma, Fran, Marta C., Luis, Uzziel, Idaira, Iris, Chuchi, y todos los demás, porque gracias a ellos mi tiempo libre ha sido intensísimo durante estos años. Por sus pacientes esperas y sus planes maravillosos.

A mi familia, primos, tíos y abuelos, porque se han sentido orgullosos de mí y porque yo también estoy muy orgullosa de ellos.

A mis padres, y de nuevo a mi hermana, por todo el tiempo que les ha robado esta tesis, por su paciencia, su cariño, su estímulo y su gran apoyo.

Introducción

1. Replicación en <i>S. pombe</i>	
1.1 Orígenes de replicación	9
1.2 Islas AT	11
1.3 Inicio de la replicación	13
2. Replicación y recombinación mitótica en <i>S.pombe</i>	
2.1 Recombinación mitótica en los orígenes de replicación	15
3. Replicación y recombinación meiótica en <i>S.pombe</i>	15
3.1 Alineamiento de los cromosomas homólogos y fase S premeiótica	17
3.2 Formación de DSBs y reparación	18
4. La proteína Rec12 y los <i>hotspots</i> de recombinación	
4.1 <i>Hotspots</i> de recombinación	20
4.2 Localización de Rec12 en el genoma	22
4.3 Configuración de la cromatina en los <i>hotspots</i> de recombinación en <i>S. pombe</i>	22
Objetivos	27
Resultados	31
1. Colocalización de orígenes de replicación y regiones de DSBs durante la meiosis en <i>S. pombe</i>	
1.1 Colocalización a nivel genómico global	31
1.2 Detección de orígenes de replicación en regiones que contienen sitios de DSBs meióticos	34
1.3 Detección de roturas meióticas en regiones que contienen islas AT	39
2. Estudio de la dependencia funcional entre la actividad del origen de replicación AT 1034 y la formación de DSBs en <i>mbsI</i>	43
2.1 Deleción de la isla AT 1034	46
2.2 Deleción de la región de 2.4 kb que contiene el <i>hotspot</i> de recombinación <i>mbsI</i>	48
2.3 Integración de dos regiones intergénicas ectópicas en el sitio <i>mbsI</i>	50
2.4 Análisis de la actividad ORI en un mutante $\Delta rec12$	53

3. Estudio de los requerimientos necesarios para la generación de roturas meióticas	
3.1 El contexto genómico determina la activación de un ORI y la formación de DSBs dependientes de Rec12	56
3.2 Una longitud de 3 kb de la región intergénica es requisito suficiente para la generación de un sitio de DSBs	
Parte I. Integración de un ORI DE 400 pb en la región de <i>rhp7⁺</i>	60
Parte II. Extensión de la región intergénica adyacente al gen <i>rhp7⁺</i>	61
Discusión	67
1. Colocalización de orígenes de replicación activos y <i>hotspots</i> de recombinación durante la meiosis en <i>S. pombe</i>	67
2. Estudio de la dependencia funcional entre la actividad del origen de replicación AT 1034 y la formación de DSBs en <i>mbs1</i>	71
2.1 Deleción de la isla AT 1034	72
2.2 Deleción de la región de 2.4 kb que contiene el <i>hotspot</i> de recombinación <i>mbs1</i>	73
2.3 Integración de dos regiones intergénicas ectópicas en el sitio <i>mbs1</i>	74
2.4 Análisis de la actividad ORI en un mutante $\Delta rec12$	74
3. Estudio de los requerimientos necesarios para la generación de roturas meióticas	
3.1 El contexto genómico determina la activación de un ORI y la formación de DSBs dependientes de Rec12	75
3.2 Una longitud de 3 kb de la región intergénica es requisito suficiente para la generación de un sitio de DSBs	77
Conclusiones	81

Materiales y Métodos	85
1. Microorganismos utilizados y medios de cultivo	
1.1 Levaduras	85
1.2 Bacterias	86
2. Técnicas de transformación de microorganismos	
2.1 Transformación de <i>E. coli</i>	86
2.2 Transformación de <i>S. pombe</i>	86
3. Técnicas de manipulación y obtención de DNA	
3.1 Aislamiento de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	87
3.2 Aislamiento de DNA genómico de <i>S. pombe</i>	87
3.3 Purificación de fragmentos de DNA	87
3.4 Ligación de fragmentos de DNA	87
4. Fusión de protoplastos	88
5. Sincronización de cultivos en meiosis	88
6. Citometría de flujo	89
7. Electroforesis bidimensional de intermediarios de replicación en geles de agarosa	
7.1 Purificación de DNA	89
7.2 Condiciones de electroforesis	90
8. Obtención de DNA en bloques de agarosa	
8.1 Purificación de DNA embebido en bloques de agarosa	90
8.2 Digestión y electroforesis de DNA embebido en bloques de agarosa	91
9. <i>Southern blot</i>	91
Bibliografía	95
Abreviaturas	105

INTRODUCCIÓN



1. REPLICACIÓN EN *S. pombe*

1.1 ORÍGENES DE REPLICACIÓN

La replicación del DNA en eucariotas es un proceso preciso y coordinado que permite que todo el genoma se duplique durante la fase S del ciclo celular y se transmita a la siguiente generación intacto. El inicio de la replicación requiere el ensamblaje de las proteínas que forman el Complejo de Reconocimiento del Origen (ORC) en múltiples sitios específicos del DNA, que son los orígenes de replicación (ORIs). ORC es un complejo heterohexamérico conservado en todos los eucariotas estudiados que se une al DNA en regiones no conservadas entre especies.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ORC se une a secuencias del DNA de 100 a 150 pares de bases (pb), que contienen elementos consenso de 11 a 17 pb (Theis & Newlon, 2001). La unión es dependiente de ATP e involucra a 5 de las 6 subunidades de ORC (1-5) (Lee & Bell, 1997) (FIGURA 1A).

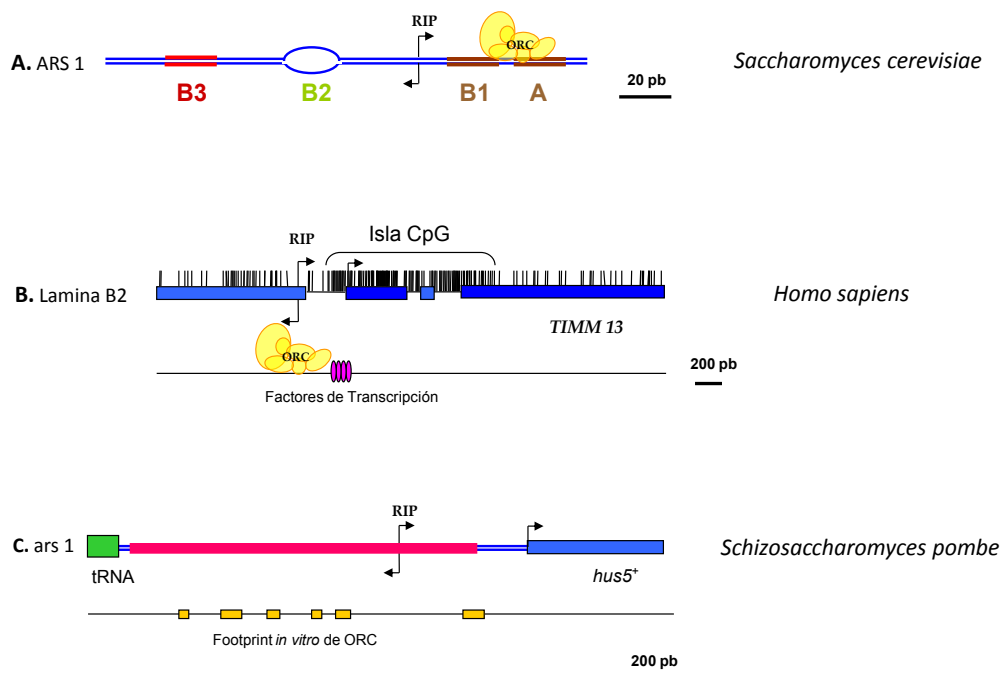


Fig.1 Representación de orígenes de replicación en distintas especies. **A.** Esquema del ORI *ARS1* de *Saccharomyces cerevisiae*. El dominio A es esencial para la activación del origen y las secuencias accesorias B1, B2 y B3 pueden sufrir mutaciones que reducen pero no abolen la actividad ORI. Al dominio B3 se une el represor transcripcional Abf1p y a los dominios A y B1 se une el complejo ORC. **B.** ORI situado entre los genes de la lamina B2 y *TIMM 13* humanos, las líneas verticales señalan dinucleótidos CpG y la llave señala la isla CpG. Los óvalos de color violeta representan los factores de transcripción unidos al promotor en la región adyacente al sitio de unión del complejo ORC. **C.** Representación del ORI *ars1* de *Schizosaccharomyces pombe*. La flecha doble señala el punto de inicio de la replicación (RIP) y la barra de color rosa representa la secuencia mínima con actividad ARS en plásmido. Los rectángulos amarillos en la línea inferior señalan los sitios de unión de ORC detectados *in vitro* (Lee et al, 2001).

El complejo ORC humano tiene la misma afinidad *in vitro* por secuencias que contienen ORIs que por otros fragmentos del genoma elegidos al azar (Vashee et al, 2003). A pesar de esta inespecificidad de unión, muchos de los orígenes de replicación en mamíferos se encuentran asociados a islas CpG (Delgado et al, 1998). Las islas CpG son regiones de aproximadamente 1 kb de longitud asociadas al 70% de los promotores humanos que tienen un contenido en los nucleótidos guanina y citosina (G+C) superior al promedio genómico del 40% y están libres de metilación (FIGURA 1B).

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* la unión específica del complejo ORC a los orígenes de replicación se hace mediante la subunidad Orc4 y no requiere ATP (Kong & DePamphilis, 2001; Lee et al, 2001) (FIGURA 1C). Esta proteína en *S. pombe* tiene la particularidad única entre los eucariotas estudiados hasta la fecha de poseer un extremo NH₂ con 9 motivos AT-hook que se unen a secuencias ricas en A+T *in vitro* e *in vivo* independientemente de su secuencia primaria (Chuang & Kelly, 1999; Moon et al, 1999; Kong & DePamphilis, 2002) (FIGURA 2).

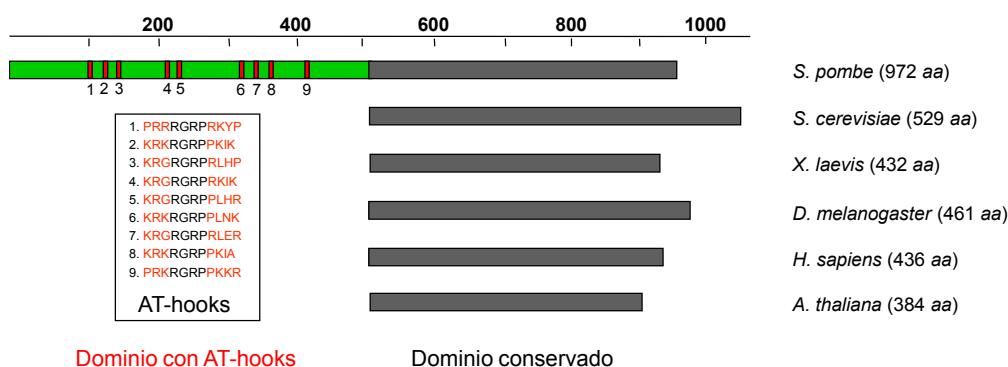


Fig.2 **Esquema de la proteína Orc4 de *S. pombe*.** El extremo carboxilo de esta proteína se conserva en todas las especies en las que se ha caracterizado (barras grises). En cambio, el extremo amino (color verde) está constituido por un dominio no conservado con nueve motivos AT-hook representados por pequeños rectángulos rojos que se unen a regiones del DNA ricas en adenina y timina. La secuencia de aminoácidos de los AT-hooks indicada en el recuadro muestra en color negro el dominio conservado en todos ellos, formado por los aminoácidos RGRP.

1.2 ISLAS AT

Los primeros orígenes de replicación de *S. pombe* se encontraron mediante ensayo ARS (secuencias de replicación autónoma) (Maundrell et al, 1988). El ensayo consistía en la digestión del genoma de la levadura con un enzima de restricción y la ligación de los fragmentos generados a un plásmido que contenía un gen marcador pero carecía de ORI. Tras la transformación de la levadura con esta mezcla de ligación, se seleccionaron aquellos fragmentos del genoma capaces de funcionar como orígenes de replicación en plásmido. En estos estudios se observó que el tamaño mínimo de estas regiones era de 500 a 1500 pb y que no había una secuencia específica requerida para la iniciación de la replicación, como se comprobó por análisis de mutagénesis en plásmidos (Maundrell et al, 1988; Dubey et al, 1994; Wohlgemuth et al, 1994; Clyne & Kelly, 1995; Dubey et al, 1996; Kim & Huberman, 1998).

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio permitieron relacionar la situación de los ORIs en el genoma con regiones que contenían promotores de genes (Gomez & Antequera, 1999). Aunque la actividad del promotor no era esencial para la activación del origen de replicación, el ensayo permitió identificar por electroforesis bidimensional 11 nuevos orígenes de replicación en el genoma que se situaban en regiones intergénicas que contenían al menos un promotor. Estos ORIs, junto con otros identificados por otros grupos, colocalizaban con regiones de hasta 1 kb ricas en A+T. Estas características permitieron definir las islas AT como regiones con un contenido en A+T igual o mayor al 75% en ventanas de 500 pb, siendo el contenido en A+T promedio del genoma un 64% y el promedio intergénico un 70%.

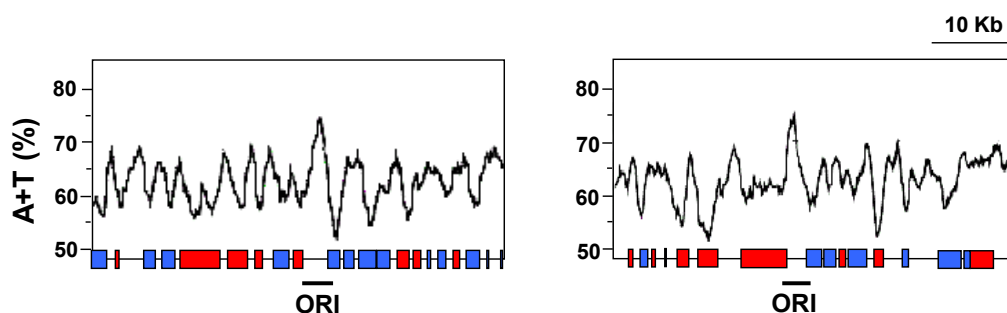


Fig.3 Representación de dos regiones del genoma de *S. pombe* que contienen dos orígenes de replicación. En el eje de ordenadas se representa el contenido A+T y en abscisas la distribución de los genes. Los rectángulos rojos representan genes que se transcriben hacia la izquierda en el dibujo y los azules hacia la derecha. Las regiones que superaban el 75% de A+T en ventanas de 500 pb fueron denominadas islas AT y en un 90% de los casos se comportaban como ORIs.

Un análisis bioinformático posterior permitió definir 384 islas AT de 0.5 a 1 kb a lo largo de todo el genoma y mediante el análisis de 20 de ellas por electroforesis bidimensional se comprobó que el 90% colocalizaban con ORIs activos en el genoma (Segurado et al, 2003). Las islas AT tienen una distancia promedio de 30 kb en el genoma y se sitúan siempre en regiones intergénicas. Si los ORIs se situaran en regiones intergénicas aleatoriamente, el 50% se localizaría en regiones intergénicas donde la transcripción de los genes adyacentes es codireccional, el 25% en regiones de transcripción divergente y el 25% restante en regiones de transcripción convergente. Pero no es así, aunque se desconoce el motivo, se observa un sesgo claro en el sentido de que el 52% de los ORIs se sitúa en regiones de transcripción divergente.

Otro estudio posterior identificó 460 regiones intergénicas (IGRs) que interaccionaban con las proteínas del complejo ORC, Orc1 y Orc4 y con la proteína Mcm6 del complejo MCM (Hayashi et al, 2007). En este trabajo se identificaron además los orígenes de replicación tempranos y tardíos o ineficientes mediante la incorporación de BrdU a las cadenas nacientes en los cultivos sincronizados durante la fase S en presencia de hidroximetilurea. A pesar del elevado porcentaje de colocalización de ORIs mediante las dos aproximaciones, este estudio permitió la detección de algunos ORIs que no colocalizaban con islas AT pero que son capaces asimismo de iniciar la replicación.

Hay una característica esencial semejante entre los ORIs de *S. pombe* y mamíferos: son regiones intergénicas de secuencia degenerada (falta de consenso). Para estudiar los requerimientos de secuencia en los ORIs de *S. pombe* se han deletado distintos elementos en 3 ORIs: ars 3001 (Kong & DePamphilis, 2002), ars 2004 (Takahashi et al, 2003) e isla AT 1090 (Cotobal et al, 2009; enviado para publicación). Los tres estudios sugieren que varias moléculas de Orc4 se unen a la región intergénica que contiene el origen de replicación o que varios elementos dentro del ORI son capaces de unir la proteína. Mientras que algunos segmentos de estas regiones son esenciales para la actividad del ORI en plásmido, no se ha encontrado ninguno que sea esencial para la activación de un ORI en el genoma.

1.3 INICIO DE LA REPLICACIÓN

En los orígenes de replicación se produce la formación de complejos proteicos que van a permitir la formación de dos horquillas de replicación que avanzarán en sentidos opuestos. Estos eventos se inician con la formación del complejo prerreplicativo (Pre-RC) que supone el ensamblaje de factores de replicación como ORC, Cdc18, Cdt1 y Mcm2-7. El estado prerreplicativo aparece al final de mitosis y persiste durante G1 (Diffley, 2004).

El factor de inicio de la replicación Cdc18 en *S. pombe* es homólogo a Cdc6 de *S. cerevisiae*. Su sobreexpresión en *S. pombe* da lugar a re-replicación (Herbig et al, 1999). Cdt1 se asocia al extremo carboxilo de Cdc18 y ambos promueven la asociación de las proteínas MCM a la cromatina (Nishitani et al, 2000). Las proteínas Mcm2-7 forman un complejo conservado en todos los eucariotas estudiados, tienen función helicasa y actúan tanto en el sitio de iniciación de la replicación (ORI) como en la elongación de la misma (horquillas de replicación) (Bell & Dutta, 2002).

La actividad de las kinasas dependientes de ciclina (CDK) promueve la replicación del DNA cuando las células entran en fase S y la actividad de estas proteínas se mantiene elevada durante la fase S, G2 y M para prevenir la reiniciación. Para que se inicie la síntesis de DNA es necesaria la acción en *S. pombe* de las kinasas CDK y Hsk1 (Cdc7 en *S. cerevisiae*), que promueven la unión al Pre-RC de otros factores: Cdc45 y GINS. Se ha demostrado que Cdc45 es requerido para el ensamblaje de algunos componentes de la maquinaria de síntesis del DNA como RPA, PCNA y las DNA polimerasas α y ϵ (Bell & Dutta, 2002) (FIGURA 4).

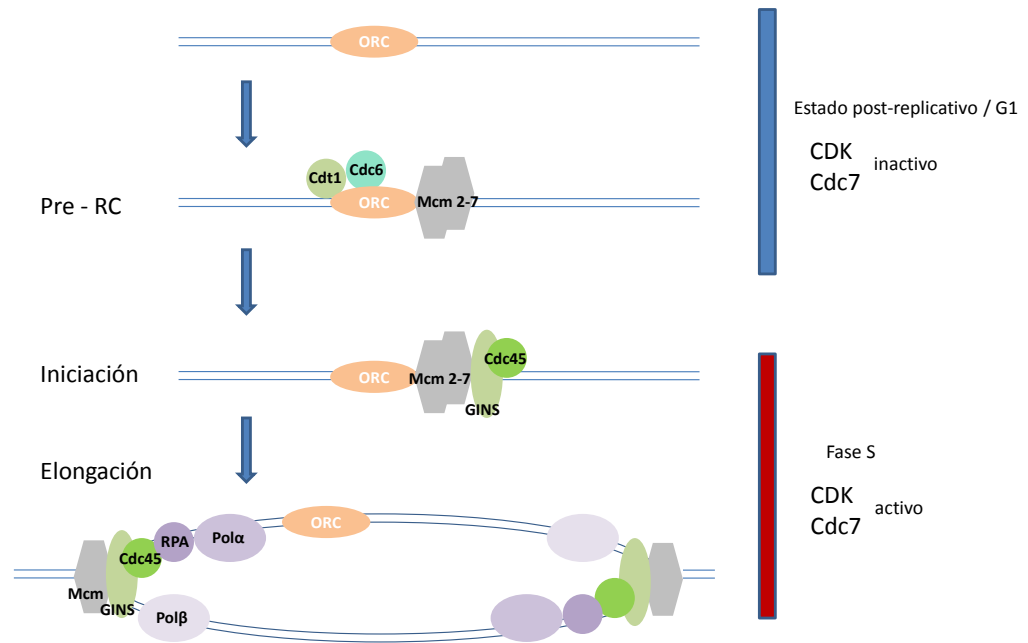


Fig.4 Mecanismo de iniciación de la replicación del DNA. Durante la fase M tardía y G1, la actividad CDK desciende y se forman los complejos prerreplicativos, las proteínas Mcm2-7 se unen a la cromatina en una reacción dependiente de ORC, Cdt1 y Cdc6. La activación de la replicación por CDK y Cdc7 provoca la unión de otros factores al ORI, como Cdc45 y GINS. Durante la elongación las polimerasas se unen a la maquinaria de replicación.

2. REPLICACIÓN Y RECOMBINACIÓN MITÓTICA EN *S. pombe*

2.1 RECOMBINACIÓN MITÓTICA EN LOS ORÍGENES DE REPLICACIÓN

La formación del complejo prerreplicativo durante G1 “licencia” los orígenes de replicación, es decir, sólo las regiones marcadas con el complejo proteico que forma el Pre-RC serán capaces de iniciar la síntesis de DNA, aunque no todas ellas se activen en cada célula durante una fase S. Una vez activados, los ORIs son incompetentes para reactivarse hasta que se completa la mitosis (Donovan & Diffley, 1996). Esto implica que cualquier bloqueo, colapso o rotura en la horquilla de replicación ha de ser reparada por recombinación homóloga o por la unión de extremos no homólogos (NHEJ), aunque este último proceso puede implicar la pérdida o modificación de algún nucleótido en el punto de unión.

Estudios previos de nuestro grupo demostraron, mediante el análisis de doce regiones del genoma por electroforesis bidimensional, que cuando el fragmento de restricción analizado contenía un ORI, además de la señal correspondiente a las burbujas de replicación, se detectaban simultáneamente estructuras en forma de X que se comportaban como intermediarios de Holliday tras incubarlas a 65°C (Segurado et al, 2002). En el mismo trabajo se analizó la frecuencia de integración de un gen marcador por recombinación homóloga en la región del genoma que contiene el ORI *arsI* tomando como control una región que no contenía ningún ORI. Los resultados indicaron que la frecuencia de integración del gen marcador en el ORI era 60 veces mayor durante la fase S que en G2 y también se observó un incremento de 60 veces respecto a la región control, donde la integración era prácticamente constante durante todo el ciclo. Estos datos permitieron relacionar la actividad de los orígenes de replicación con una alta tasa de recombinación homóloga durante la mitosis.

3. REPLICACIÓN Y RECOMBINACIÓN MEIÓTICA EN *S. pombe*

Cuando hay escasez de nitrógeno en el medio y se encuentran dos células haploides de distinto tipo sexual (h^+ , h^-), éstas conjugan para dar lugar a un cigoto diploide. Tras la fusión de los núcleos, los telómeros se unen al cuerpo polar del huso (SPB) y se alinean los cromosomas formando el “*bouquet*” (ramillete) meiótico. En este estadio se produce el movimiento de “*horsetail*” (cola de caballo) durante el cual se llevan a cabo la replicación del DNA (fase S premeiótica) y la recombinación (generación de roturas de doble cadena o DSBs (*double strand breaks*) y reparación de las mismas). Después se producen dos divisiones nucleares consecutivas, Meiosis I y II, de manera que en la primera se separan los cromosomas homólogos y en la segunda las cromátidas hermanas. El resultado son cuatro esporas haploides.

La recombinación homóloga tiene dos funciones muy importantes durante la meiosis: por una parte favorece la conexión física necesaria para el apareamiento de los cromosomas homólogos y la correcta segregación durante la Meiosis I y por otra permite la generación de diversidad genética en la progenie (FIGURA 5).

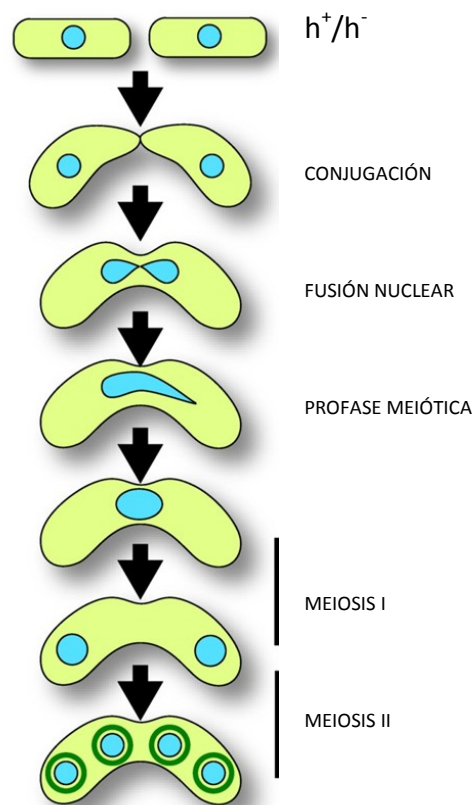


Fig.5. Esquema de la meiosis en *S. pombe*.

3.1 ALINEAMIENTO DE LOS CROMOSOMAS HOMÓLOGOS Y FASE S PREMEIÓTICA

Los mutantes *tht1* y *tht2* de *S. pombe* son deficientes en la fusión nuclear, dando lugar a esporas en las que no ha habido recombinación entre homólogos, aunque sí son capaces de generar roturas meióticas (DSBs) que se reparan normalmente. Los núcleos sufren meiosis aberrantes en las que en ocasiones sólo hay una división nuclear (Martín-Castellanos et al, 2005).

Para el anclaje de los telómeros al SPB y formación del *bouquet* son necesarias las proteínas Bqt1 y Bqt2, que forman un complejo que une los telómeros al SPB a través de Taz1, unida al telómero. En ausencia de Taz1, Bqt1 o Bqt2 hay movimiento nuclear, pero como los telómeros no están unidos al SPB, el núcleo no adopta la forma de *horsetail* y los cromosomas no se alinean de manera correcta. El *bouquet* evita la recombinación ectópica de manera que el mutante *bqt2*, en el que los cromosomas no se alinean, tiene una frecuencia de recombinación ectópica 20 veces mayor que el silvestre (Davis & Smith, 2006).

La dineína es el motor para el movimiento de *horsetail*, sus componentes Dhc1, Dlc1 y Ssm4 son esenciales para que el núcleo se mueva y los cromosomas homólogos permanezcan alineados. La unión de la dineína a los microtúbulos requiere la acción de Mcp5 (Saito et al, 2006; Yamashita & Yamamoto, 2006).

Durante este estadio se producen la replicación del DNA y la recombinación meiótica. Numerosos factores implicados en la replicación mitótica se encuentran conservados en la fase S premeiótica (Iino et al, 1995) pero de la mayoría de ellos aún se desconoce si desempeñan las mismas funciones en ambos procesos (Forsburg & Hodson, 2000). Algunas de las proteínas estudiadas y que se ha visto que desempeñan funciones paralelas en ambos procesos han sido la kinasa Cdc2 (Iino et al, 1995) y también ORC, Cdc18 y MCM (Murakami & Nurse, 2001; Lindner et al, 2002).

La correcta replicación del DNA es necesaria para la progresión de la meiosis. La ruta Rad3-Cds1 impide la generación de DSBs meióticos cuando se inhibe la fase S premeiótica en presencia de hidroxurea. Este *checkpoint* suprime la transcripción de *mei4⁺* que es requerido para la formación de DSBs (Ogino & Masai, 2006).

Existen proteínas de replicación involucradas en la recombinación meiótica. La kinasa Cdc7 está altamente conservada y se sabe que es esencial para la replicación del DNA en mitosis. Hsk1 es homólogo en *S. pombe* a Cdc7 y en el mutante termosensible *hsk1-89* no se produce el remodelamiento de la cromatina en el *hotspot* de recombinación *ade6M26* inducido en meiosis. La fase S premeiótica sólo sufre un ligero retraso pero existe un bloqueo en Meiosis I en estas células, que incluso en ausencia de algunas kinasas de *checkpoint* meiótico Chk1, Cds1 y en ausencia de ambas, no son capaces de formar DSBs (Ogino et al, 2006).

Durante la replicación meiótica las cohesinas Rec8 y Rec11 se unen al DNA reemplazando a la cohesina mitótica Rad21, que es liberada por la separasa Cut1 para la segregación de cromátidas hermanas. En meiosis, Rec8 permanece unida a los centrómeros durante la Meiosis I manteniendo unidas las cromátidas hermanas gracias a la proteína Sgo1, permitiendo que segreguen juntas en la primera división meiótica (Kitajima et al, 2004).

3.2 FORMACIÓN DE Y REPARACIÓN DE DSBs

Para permitir la recombinación, los cromosomas homólogos permanecen apareados durante la profase meiótica gracias a una estructura proteica llamada Complejo Sinaptonémico (SC). Esta estructura consiste en dos ejes paralelos (elementos laterales) a cada uno de los cuales se une la cromátida hermana de un cromosoma replicado. Los elementos laterales se unen por los filamentos transversales. La estructura del SC está muy conservada evolutivamente, pero su composición molecular es bastante más heterogénea. En *S. pombe*, en lugar del SC existen los elementos lineales (LinEs) que se observan durante la profase meiótica como líneas individuales de diferentes longitudes o formando redes o haces. En los LinEs de *S. pombe* aparecen proteínas homólogas a los componentes del SC en *S. cerevisiae*, como Rec10, Hop1 y Mek1 (Lorenz et al, 2004).

Los DSBs meióticos en *S. pombe* son producidos por Rec12, ortólogo a Spo11 de *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* se ha comprobado que para una completa formación del SC es necesaria la correcta generación de DSBs. En mutantes de *spo11* con una pérdida de función parcial, en los que los defectos en la formación de DSBs eran progresivamente más severos, se observó una correspondencia con defectos en la formación del SC (Henderson & Keeney, 2004). En cambio en el mutante *rec12-152* de *S. pombe*, la formación de los LinEs no se ve modificada (Lorenz et al, 2004).

Rec8, Rec11, Rec25 y Rec27 son esenciales para la formación de filamentos de Rec10 (Lorenz et al, 2004; Davis et al, 2008). Rec10 es un componente de los elementos lineales esencial para que se formen los focos de agregados de Rec7. No se ha estudiado si Rec7 se sitúa en los sitios de DSBs pero sí se ha observado que el número de focos de Rec7 por célula es de 22 a 50 (Lorenz et al, 2006), que es el número de intercambios genéticos esperados en una meiosis (Munz, 1994).

En el procesamiento de los DSBs generados por Rec12 están involucradas multitud de proteínas. El complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) está altamente conservado en eucariotas, tiene actividad exo- y endonucleasa y es esencial para la recombinación meiótica en todos los organismos en que se ha estudiado. En el mutante de *S. cerevisiae rad50S* no se generan DSBs, en cambio en *S. pombe rad50S* las células sí hacen DSBs pero no son capaces de repararlos, los complejos DNA-Rec12 se acumulan en estos mutantes (Young et al, 2002).

Rad22B, Rti1, Rhp55-57, Swi5-Sfr1, Dmc1 y Rad51 son proteínas implicadas en la generación de extremos 3' libres donde estaba la rotura de doble cadena y en la búsqueda de una secuencia homóloga en el cromosoma homólogo o en la cromátida hermana que sirva como molde para copiar la información perdida.

Estudios de microscopía electrónica llevados a cabo recientemente han demostrado que la mayoría de las estructuras de Holliday formadas en *S. pombe* durante la recombinación meiótica son sencillas y no dobles. Y por electroforesis bidimensional en el mismo trabajo se demuestra que la mayoría de los intercambios se realizan con la cromátida hermana y no con el cromosoma homólogo (Cromie et al, 2006).

En *S. pombe* la resolución de las estructuras de Holliday se lleva a cabo por el complejo Mus1-Eme1 (Cromie et al, 2006) (FIGURA 6).

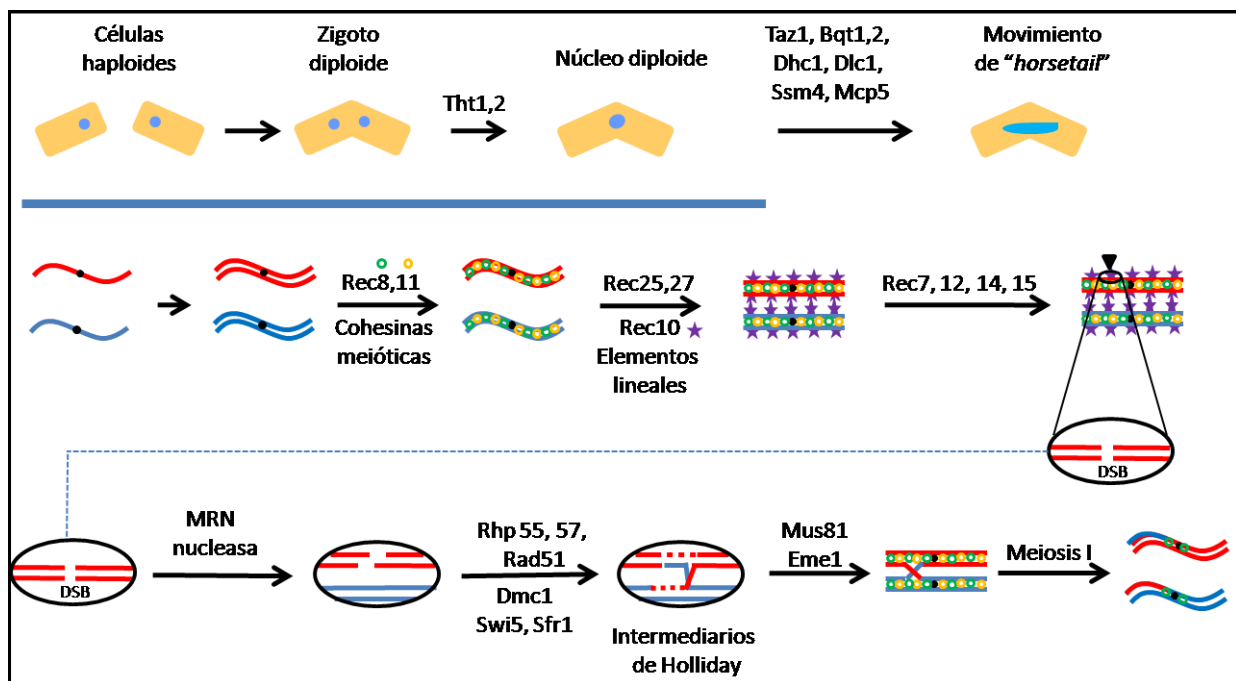


Fig.6 Esquema con algunas proteínas implicadas en la recombinación meiótica. Modificado de: labs.fhcr.org/gsmith/images/pombe-p-way.jpg.

4. LA PROTEÍNA Rec12 Y LOS *HOTSPOTS* DE RECOMBINACIÓN

Hay unas 12 proteínas esenciales para la formación de las roturas meióticas. Una de estas proteínas es Rec12, la subunidad catalítica que introduce las roturas en el DNA. Rec12 es ortólogo a la subunidad A de la Topoisomerasa VI de *Sulfolobus shibatae*. Durante su acción endonucleasa, la proteína se une covalentemente al extremo 5' del DNA roto por un residuo de tirosina (Tyr-98). Los mutantes en esta tirosina son deficientes en recombinación meiótica (Cervantes et al, 2000). Las topoisomerasas tipo II funcionan como dímeros e inducen DSBs transitorios, de manera que pasan una segunda cadena de DNA a través de ellos y vuelven a religar el DNA roto. En eucariotas son homodímeros en los cuales cada subunidad contiene un dominio catalítico y un dominio ATPasa involucrado en el traspaso de la otra cadena de DNA. En bacterias y archaea las topoisomerasas II funcionan como heterotetrámeros, donde las subunidades catalítica y ATPasa están en distintos polipéptidos. Así Rec12 es ortólogo a la subunidad catalítica, ya que no requiere el traspaso de la otra cadena de DNA. La reparación de la rotura se produce por recombinación homóloga.

4.1 *HOTSPOTS* DE RECOMBINACIÓN

Rec12 no genera roturas de manera uniforme a lo largo de los cromosomas, de manera que hay sitios en el genoma con una frecuencia más alta de roturas que el resto, los *hotspots* de recombinación. Inicialmente se detectaron como intervalos cromosómicos con una intensidad de recombinación elevada (Gutz, 1971). En todos los organismos estudiados los cromosomas tienen estos intervalos pero uno de los mejor estudiados ha sido la mutación *ade6-M26* de *S. pombe*.

Este *hotspot* se identificó como una mutación en el gen *ade6*, *ade6-M26*, que tenía niveles de recombinación 20 veces mayores que otros alelos *ade6* (Gutz, 1971). El *hotspot* proviene de una mutación simple G→T que da lugar a un codón sin sentido en el extremo 5' del gen *ade6*. Esta mutación crea un heptámero esencial para la actividad *hotspot*: 5'-ATGACGT-3' (Schuchert et al, 1991). Esta secuencia es parte del sitio de unión del factor de transcripción Atf1-Pcr1, el cual es también necesario para la actividad del *hotspot* (Kon et al, 1997). Además del sitio M26, existe una secuencia muy parecida, llamada CRE (Cyclic AMP response element) 5'-TGACGTC/A-3', que también genera un *hotspot* en el gen *ade6* y es dependiente de Atf1-Pcr1 (Fox et al, 2000). Estos heptámeros son muy abundantes en el genoma y no siempre funcionan como *hotspots* pero han servido para la localización de numerosos sitios de recombinación naturales.

En un estudio llevado a cabo por [Steiner & Smith \(2005a\)](#) se utilizó una secuencia más extendida de la cual forma parte el heptámero M26, 5'-GNVTATGACG CATNBNC-3' (V es A, C o G; B es C, G o T; N es cualquier nucleótido). En este estudio 10 de los 15 sitios del genoma analizados resultaron ser sitios donde se producen DSBs meióticos como máximo a 1 kb del sitio M26. En 3 de ellos los DSBs se encontraron a más de 1 kb del sitio M26 y sólo en 2 no se hallaron DSBs. Sólo uno de estos sitios de DSBs se localiza dentro de la ORF de un gen, *cds1*⁺, y en él se confirmó genéticamente la actividad *hotspot*. A pesar de que el heptámero sirvió para localizar estos sitios de rotura, en el mismo trabajo se comprobó que no todos ellos dependen el factor Atf1-Pcr1, ya que algunos se generan igualmente en ausencia de éste.

Hasta entonces sólo se había conocido la ubicación en el genoma de un sitio de recombinación natural, *mbs1* ([Young et al, 2002](#)) que es el sitio de recombinación natural mejor estudiado en *S. pombe*. Se localizó mediante el análisis por *Southern blot* de DNA no digerido. Las muestras fueron tomadas durante una meiosis sincrónica y los cromosomas se separaron en una electroforesis de campo pulsado. Cuando este DNA se hibridó con la sonda del gen *ura1*⁺ se observó una banda correspondiente al cromosoma I intacto y varias bandas de menor tamaño que aparecían en los tiempos de recombinación meiótica. Una de las bandas pequeñas más prominentes era de un tamaño de 0.75 Mb, que era la distancia aproximada del gen *ura1*⁺ al extremo izquierdo (brazo largo) del cromosoma I, esto indicaba que cerca de esta región había un sitio de DSBs ([Cervantes et al, 2000](#)). En un trabajo posterior se digirió el DNA con NotI y se hibridó con la misma sonda. Dentro del fragmento NotI de 501 kb se halló una región de DSBs prominentes que se denominó *meiotic break site I* (*mbs1*). A continuación se analizó una digestión PmeI que permitió localizar *mbs1* en una región libre de transcripción de una longitud de 6 kb en el cósmido SPAC4G8 del cromosoma I ([Young et al, 2002](#)). Para una mayor resolución se analizaron fragmentos de DNA más pequeños generados por SpeI o HpaI y las hibridaciones mostraron cuatro grupos de DSBs a lo largo de 2.1 kb. En el mismo trabajo se demostró, además, que *mbs1* era un *hotspot* de conversión génica y de *crossing-over* por análisis de tétradas tras la integración de diversos marcadores en regiones adyacentes ([Cromie et al, 2005](#)).

4.2 LOCALIZACIÓN DE Rec12 EN EL GENOMA

El primer estudio de la distribución global de DSBs en *S. pombe* se hizo mediante la inmunoprecipitación de cromatina de una cepa *Rec12-FLAG rad50S* en la que las roturas meióticas se generan pero no son reparadas (Cromie et al, 2007). Estas células eran también mutantes termosensibles *pat1-114* que inician meiosis sincrónicas cuando se alcanza la temperatura restrictiva incluso en estado haploide. Se utilizaron *tiling microarrays* que permitieron detectar la señal de DNA unido a Rec12 a lo largo de todo el genoma.

Los lugares en los que detectaron señales de unión de Rec12 al DNA carecen de una secuencia consenso y la única característica común a todos ellos es que se trata de regiones intergénicas (IGRs) grandes: aproximadamente el 50% de las regiones intergénicas mayores de 3 kb tienen unido Rec12 y estas regiones contienen el 50% de todas las señales de Rec12 detectadas.

Dado que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se habían encontrado diferencias notables entre la localización de Spo11 en *rad50S* y *rad50*⁺ (Buhler et al, 2007), se llevó a cabo esta comprobación en *S. pombe*. A diferencia de *S. cerevisiae*, la localización de Rec12 es idéntica en las cepas en *S. pombe rad50S* y *rad50*⁺ (Hyppa et al, 2008). Este estudio refleja una regulación diferente de los DSBs y un requerimiento distinto del complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) del que forma parte la proteína Rad50 en estas dos especies.

4.3 CONFIGURACIÓN DE LA CROMATINA EN LOS *HOTSPOTS* DE RECOMBINACIÓN EN *S. pombe*

En el *hotspot* de recombinación *ade6M26* se ha encontrado una mayor accesibilidad de la cromatina durante la meiosis. Como explicábamos anteriormente, la activación de este *hotspot* de recombinación en *S. pombe* está mediada por la secuencia M26 y por el factor de transcripción Atf1-Pcr1. En un trabajo llevado a cabo por Yamada et al (2004) se demostró que las histonas H3 y H4 alrededor de M26 estaban hiperacetiladas en meiosis dependiendo de la presencia de la mutación M26 y de Atf1. También se observó que la acetiltransferasa de histonas de *S. pombe* Gcn5 era requerida para la mayoría de la acetilación de la histona H3 alrededor de M26 *in vivo*. La delección de *gcn5*⁺ causaba un retraso significativo en el remodelamiento de la cromatina y una reducción parcial de la recombinación meiótica en M26. Asimismo la delección de *snf22*⁺ (proteína del tipo ADCR, remodeladores de la cromatina dependientes de ATP) y de *gcn5*⁺*snf22*⁺ era capaz de abolir el remodelamiento de la cromatina y la reducción de la recombinación meiótica en M26 era significativa.

También se ha estudiado si la cromatina sufría alteraciones antes de la recombinación meiótica en *hotspots* de recombinación naturales (Hirota et al, 2007). Se midió la sensibilidad de la cromatina a la nucleasa micrococcal en 3 *hotspots*: *mbs1*, *tdh1*⁺ y *cds1*⁺. Los resultados mostraron que la apertura de la cromatina en los *hotspots* de recombinación era un proceso asociado a la formación de los DSBs meióticos pero que podía ser constitutivo (*mbs1* y *cds1*⁺) o inducido únicamente en meiosis (*tdh1*⁺) y dependiente del factor Atf1-Pcr1 (*tdh1*⁺ y *cds1*⁺) o independiente (*mbs1*). En el mismo trabajo se comprobó que la mayor accesibilidad de la cromatina en estos sitios durante la meiosis es independiente de la presencia de las proteínas de recombinación Rec7, Rec8, Rec10, Rec12, Rec14, Rec15 y Mei4. En concordancia con este último dato se observó que la unión de Rec12 a los *hotspot* de recombinación requiere una previa configuración abierta de la cromatina, ya sea inducida en meiosis o constitutiva.

1. Análisis de la colocalización a nivel genómico y de la posible dependencia funcional entre la activación de los orígenes de replicación y la generación de roturas de DNA de doble cadena durante la meiosis en *S. pombe*.

2. Identificación de los requerimientos necesarios para la generación de roturas de DNA de doble cadena previas a la recombinación meiótica en *S. pombe*.

1. COLOCALIZACIÓN DE ORÍGENES DE REPLICACIÓN Y REGIONES DE DSBs DURANTE LA MEIOSIS EN *S. pombe*

1.1 COLOCALIZACIÓN A NIVEL GENÓMICO

El *hotspot* de recombinación natural mejor estudiado en *S. pombe* es *mbs1* (*meiotic break site 1*). Se observó que los DSBs se extendían a lo largo de 2.1 kb en una región intergénica de 6 kb del cromosoma I que se situaba entre los genes SPAC4G8.03 y SPAC4G8.04 (Young et al, 2002). En la misma región intergénica que *mbs1* existe también un origen de replicación, la isla AT 1034, que es un ORI activo en mitosis y en meiosis.

Dada la colocalización del ORI AT 1034 con el *hotspot* de recombinación *mbs1* y la alta tasa de recombinación encontrada en los orígenes de replicación durante la mitosis (ver apartado 2 de la Introducción) (Segurado et al, 2002), decidimos comprobar si los ORIs y los DSBs colocalizaban a nivel genómico durante la meiosis. Los DSBs se generan en sitios concretos del genoma (*hotspots*) durante la profase meiótica. Su reparación por recombinación homóloga favorece el *crossing-over* o intercambio de cadenas de DNA y la correcta segregación de los cromosomas homólogos.

Para realizar este estudio a nivel genómico utilizamos mapas de ORIs y DSBs llevados a cabo por nuestro grupo y por otros que se describen a continuación.

Como mapa genómico de referencia para DSBs se utilizaron las predicciones realizadas en el trabajo de Cromie et al (2007) mediante la inmunoprecipitación de cromatina de una cepa *Rec12-FLAG rad50S*. En este mutante, la endonucleasa Rec12 genera roturas en el DNA pero permanece unida a éstas covalentemente de manera que no son reparadas. Con el DNA inmunoprecipitado se hibridó un *microarray* que contenía 41000 sondas de 60 pb espaciadas 300 pb a lo largo de todo el genoma. En el mismo trabajo se comprobó por *Southern blot* que las zonas de unión de Rec12 detectadas en el *microarray* en 25 regiones del cromosoma I coincidían con sitios de roturas meióticas. Posteriormente el mismo grupo de investigación demostró que el mapa genómico de los sitios de rotura en la cepa silvestre es idéntico al de la cepa *rad50S* (Hyppa et al, 2008) (ver apartado 4.2 de la Introducción).

Existía otro análisis genómico de la localización de Rec12 en una cepa *S. pombe Rec12-myc rad50S* (Ludin et al, 2008). No se utilizó este trabajo como base de datos para este estudio por dos motivos. El primero es que la inmunoprecipitación de la cromatina se realizó después de llevar a cabo un *cross-linking* con formaldehído para fijar covalentemente las proteínas al DNA, de manera que en este análisis la proteína Rec12 aparece distribuida más uniformemente a lo largo del genoma que en el trabajo de Cromie et al (2007), quizá debido a que sólo una fracción de Rec12 está unida

covalentemente al DNA generando activamente las roturas. El segundo motivo fue que las hibridaciones se llevaron a cabo en 2 *microarrays*, uno de regiones codificantes (ORFs) y otro de regiones intergénicas (IGRs). El gran tamaño de las sondas utilizadas (hasta 1 kb) y la gran distancia entre ellas (hasta 2 kb) hizo que sólo se detectaran 114 sitios de unión de Rec12 frente a los 304 (194 de ellos prominentes) localizados en el trabajo de [Cromie et al \(2007\)](#). Por ejemplo el *hotspot mbs1* no se encuentra entre ellos por falta de señal de hibridación de las sondas adyacentes.

Como mapas genómicos de orígenes de replicación se utilizaron los descritos por [Segurado et al \(2003\)](#) y [Hayashi et al \(2007\)](#) (ver apartado 1.2 Introducción) aunque en ambos casos eran predicciones de orígenes mitóticos. El único mapa de orígenes meióticos publicado hasta la fecha ha sido realizado por [Heichinger et al \(2006\)](#). Este mapa, generado mediante la hibridación de *microarrays* de *S. pombe* con moléculas de DNA naciente, es de baja resolución ya que en ocasiones los ORIs meióticos se anotaron en grandes regiones que contenían hasta 5 ORFs de genes. Este mapa no se utilizó como base de datos debido a que el gran tamaño de las regiones descritas provocaría un sesgo positivo en la colocalización con los sitios de rotura.



Fig.7 Colocalización genómica de ORIs y DSBs. Se consideraron 469 ORIs mitóticos, que incluían las islas AT ([Segurado et al, 2003](#)) y los ORIs de [Hayashi et al \(2007\)](#) (en la mayor parte de las ocasiones colocalizaban y sólo se tuvo en cuenta un valor). De ellos, 171 se encuentran a menos de 2 kb de un sitio de unión de la proteína Rec12 (localizados en el trabajo de [Cromie et al \(2007\)](#)).

Tras el análisis genómico de la colocación de ORIs y DSBs a partir de los mapas descritos anteriormente, pudimos comprobar que de los 469 ORIs mitóticos considerados para el análisis, 171 se encontraban a menos de 2 kb de distancia de uno de los 304 sitios de unión de Rec12 descritos por [Cromie et al. \(2007\)](#). Teniendo en cuenta que en el genoma de *S. pombe* existen 5000 regiones intergénicas, los 469 ORIs descritos ocupan el 9.4% de ellas, y nosotros observamos que el 56.2% de los sitios de unión de Rec12 (DSBs) coincidía con un ORI (**FIGURA 7**). Esto supone un incremento de aproximadamente 6 veces respecto a la colocación que pudiera deberse al azar. Según esta estimación el 56.2% de los sitios de rotura predichos colocalizaban con un origen de replicación y el 36.5% de los ORIs colocalizaban con un sitio de DSBs. Además, se podría esperar que la colocación real fuese mayor, ya que como se describe en el siguiente apartado (1.2) de Resultados, existen orígenes de replicación específicos de meiosis que no se activan en fase S mitótica y no habían sido descritos en la bibliografía. Asimismo, como se describe en el apartado 1.3 se encontraron en este trabajo sitios de rotura que no son detectados como señales de Rec12 en el *microarray*. Por lo tanto esta colocación genómica es una estimación mínima. En nuestro laboratorio se están llevando a cabo experimentos que nos permitirán localizar los orígenes de replicación meióticos por inmunoprecipitación de cromatina frente a Orc4 y Orc1 durante la fase S premeiótica.

Estos resultados nos permitieron concluir que la colocación de ORIs y DSBs meióticos a nivel genómico es 6 veces mayor de la esperada si se debiera al azar, a pesar de que las predicciones de orígenes de replicación hagan referencia a ORIs mitóticos.

1.2 DETECCIÓN DE ORÍGENES DE REPLICACIÓN EN REGIONES QUE CONTIENEN SITIOS DE DSBs MEIÓTICOS

El *hotspot* de recombinación *ade6M26* se produce por una mutación puntual G→T que da lugar a un codón sin sentido en el extremo 5' del gen *ade6*. Esta mutación crea el heptámero 5'-ATGACGT-3' que es esencial para la actividad del *hotspot* (Schuchert et al, 1991) y forma parte del sitio de unión del factor de transcripción Atf1-Pcr1, que también es esencial para la actividad del *hotspot*. Mediante la integración del heptámero en diferentes posiciones y orientaciones dentro del gen *ade6*, se observó que M26 formaba parte de una secuencia más extendida, que se llamó M26_{CS}, 5'-GNVTATGACGTCATNBNC-3' (V es A, C o G; B es C, G o T; N es cualquier nucleótido) que era la responsable de la unión de Atf1-Pcr1 (Steiner & Smith, 2005b) (ver apartado 4.1 Introducción). La búsqueda de esta secuencia M26_{CS} en el genoma de *S. pombe* permitió identificar 15 regiones que se analizaron por *Southern Blot* y en 13 de ellas se detectaron DSBs durante la recombinación meiótica (FIGURA 8) (Steiner & Smith, 2005a). En el mismo trabajo se comprobó en un mutante $\Delta pcr1$ que en tres de estas regiones la formación de DSBs era independiente del factor de transcripción.

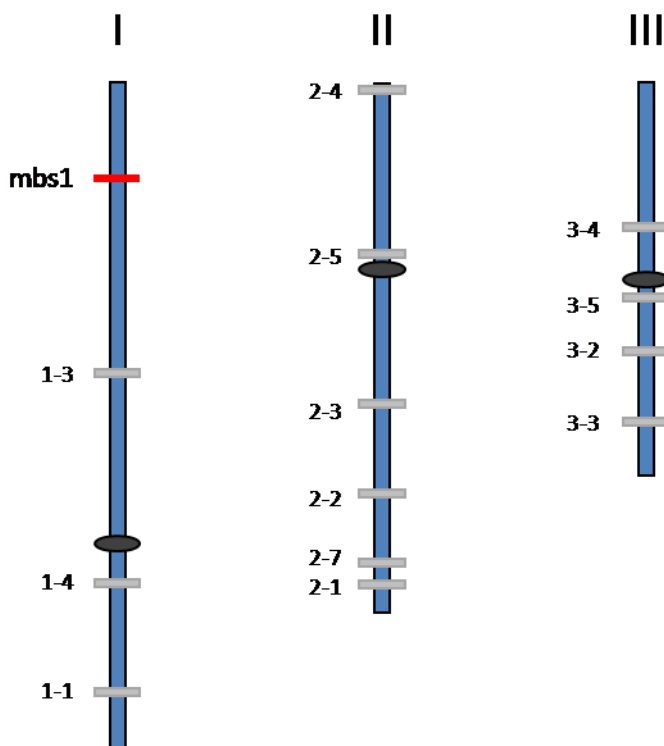


Fig.8 Esquema de los tres cromosomas de *S. pombe* (I, II y III) con la localización de los 13 sitios de DSBs identificados por (Steiner & Smith, 2005a) y el sitio *mbs1*. Los óvalos negros indican la situación de los centrómeros. Los sitios de DSBs se señalan con barras horizontales de color gris y *mbs1* de color rojo.

Hasta entonces sólo se había conocido la ubicación en el genoma del sitio de recombinación natural *mbsI* (Young et al, 2002). En este sitio, las roturas de doble cadena se habían localizado detalladamente y se había comprobado su actividad como *hotspot* de recombinación (Cromie et al, 2005). *MbsI* no contenía la secuencia M26_{CS} y su actividad no dependía del factor Atf1-Pcr1. Como comentábamos en el apartado anterior la misma región intergénica de *mbsI* hay un origen de replicación activo en mitosis y meiosis, que colocaliza con la isla AT 1034 (FIGURA 15A).

El objetivo de esta parte del trabajo fue analizar la posible presencia de orígenes de replicación activos durante la fase S premeiótica en las 13 regiones intergénicas del genoma en las que Steiner & Smith (2005a) habían comprobado la presencia de DSBs. Solamente 6 de estas 13 regiones colocalizaban con ORIs descritos por Hayashi et al (2007) o Segurado et al (2003) de manera que esta muestra de DSBs nos permitiría comprobar experimentalmente si había una colocalización mayor de la predicha en el apartado anterior. Uno de estos sitios (sitio 3-4, FIGURA 8) se encontraba en una región codificante, la ORF del gen *cds1*⁺ y ésta fue la única región de las 13 en la que no analizamos la presencia de un ORI, ya que todos los orígenes de replicación descritos hasta entonces en *S. pombe* se encontraban en regiones intergénicas. Además analizamos la región del *hotspot mbsI*.

La detección de los intermediarios de replicación se realizó mediante electroforesis bidimensional. La técnica se llevó a cabo adaptando las condiciones descritas por Brewer & Fangman (1987) (ver apartado 7 de Materiales y métodos) (FIGURA 9).

Para sincronizar los cultivos en meiosis se utilizó la cepa de *S. pombe pat1-114*. Esta cepa, descrita por Iino & Yamamoto (1985), tiene el gen de la kinasa Pat1 regulado por un promotor termosensible que permite la inactivación del gen a la temperatura restrictiva de 34°C (FIGURA 10). La inactivación de la kinasa provoca la activación del gen *mei2*⁺ y el desencadenamiento de una meiosis sincrónica en el cultivo (ver apartado 5 de Materiales y métodos).

Mediante el análisis de citometría por FACS se comprobó que la fase S premeiótica se iniciaba una hora y cuarto después del comienzo de la meiosis sincrónica (FIGURA 10).

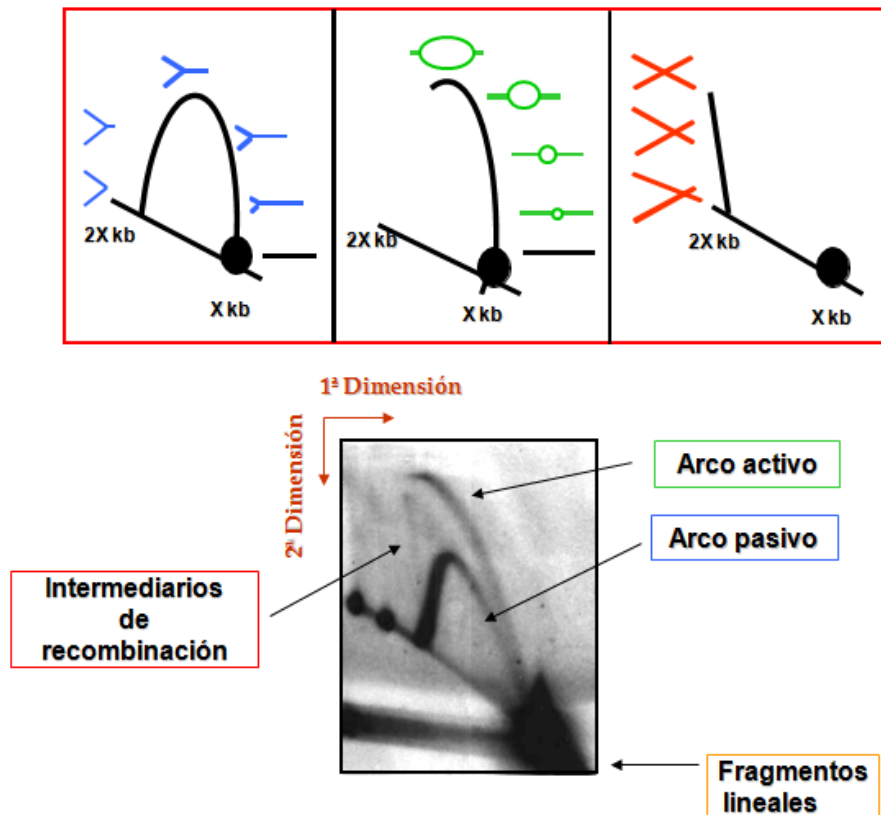


Fig.9 **Electroforesis bidimensional en geles de agarosa.** Mediante esta técnica se pueden detectar horquillas de replicación que forman el arco pasivo y que proceden de la activación de otros ORIs fuera del fragmento de restricción analizado. Los fragmentos que contienen burbujas de replicación generadas por un ORI activo tienen movilidad diferente y generan el arco activo. También puede observarse en ocasiones una señal casi vertical de tamaño 2X correspondiente a los intermediarios de recombinación.

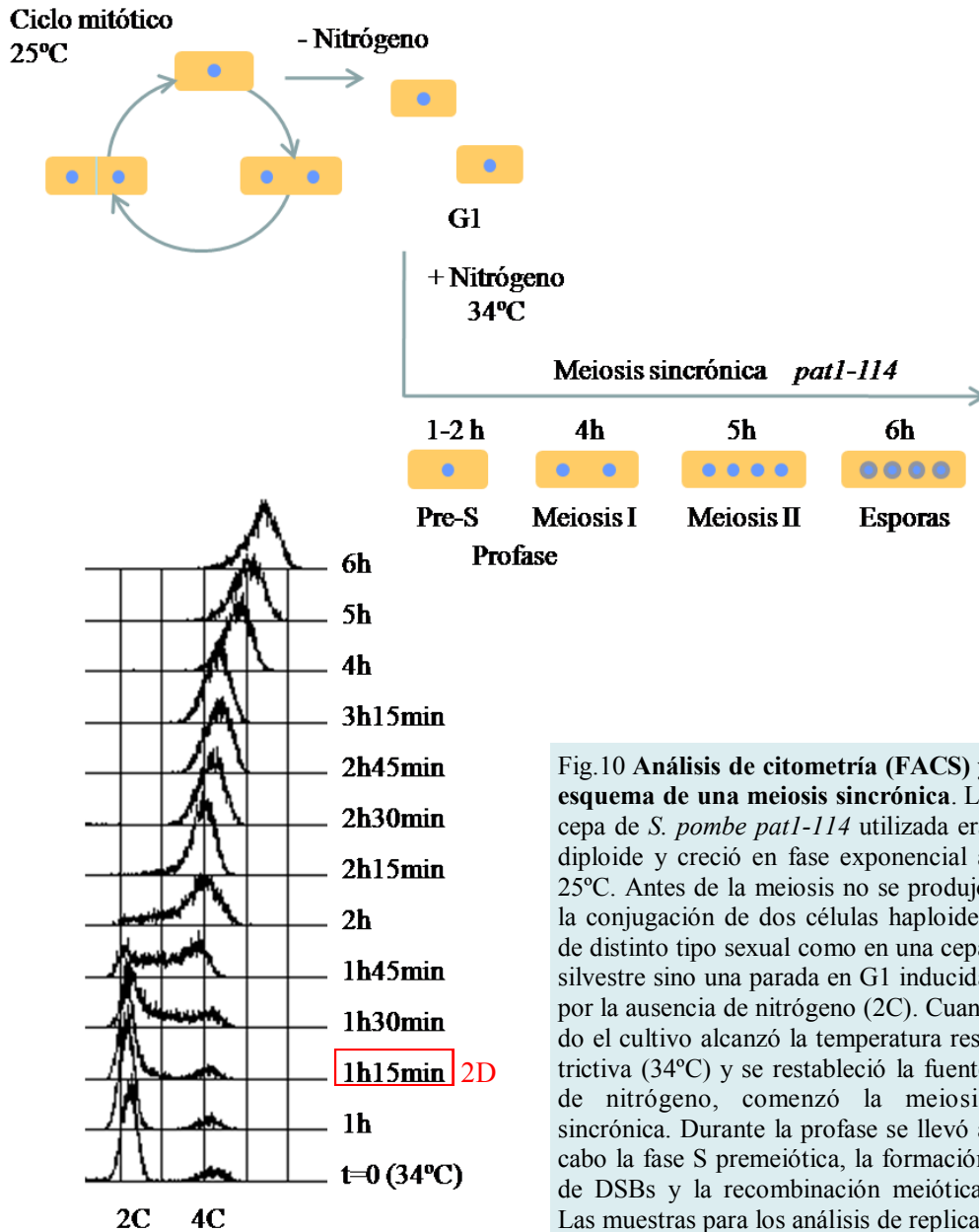


Fig.10 Análisis de citometría (FACS) y esquema de una meiosis sincrónica. La cepa de *S. pombe pat1-114* utilizada era diploide y creció en fase exponencial a 25°C. Antes de la meiosis no se produjo la conjugación de dos células haploides de distinto tipo sexual como en una cepa silvestre sino una parada en G1 inducida por la ausencia de nitrógeno (2C). Cuando el cultivo alcanzó la temperatura restrictiva (34°C) y se restableció la fuente de nitrógeno, comenzó la meiosis sincrónica. Durante la profase se llevó a cabo la fase S premeiótica, la formación de DSBs y la recombinación meiótica. Las muestras para los análisis de replicación mediante electroforesis bidimensional se tomaron a 1 hora 15 minutos.

El análisis mediante electroforesis bidimensional de 13 de las 14 regiones indicadas en la **FIGURA 8** reveló que 8 de ellas estaban asociadas con orígenes de replicación meióticos (**FIGURA 11**). Esto indicaba que al menos en el tiempo de la meiosis sincrónica en la que habían sido extraídas las muestras de DNA, el 61% de las regiones analizadas colocalizaban con ORIs meióticos. Algunas de estas regiones habían sido descritas como orígenes potenciales de replicación mitótica según las predicciones de [Segurado et al \(2003\)](#) y [Hayashi et al \(2007\)](#) (ver apartado 1.2 Introducción). En el primer trabajo se relacionaron los orígenes de replicación con regiones ricas en los nucleótidos adenina y timina que se definieron como islas AT. En el caso de los sitios 1-4, 2-1, 2-4 y 2-5, esas regiones colocalizaban con las islas AT 1134, 2132, 2010 y 2049, respectivamente ([Segurado et al, 2003](#)). En el trabajo de [Hayashi et al \(2007\)](#), que se utilizó también como mapa genómico de predicción de ORIs, se identificaron por inmunoprecipitación de cromatina 460 regiones intergénicas que interaccionaban con las proteínas Orc1 y Orc4 del complejo ORC y con la proteína Mcm6 del complejo MCM, la mayoría de estas regiones colocalizaban con islas AT. Así los sitios 1-1, 1-4, 2-1, 2-4, 2-5 y 3-2, colocalizaban con los ORIs 1191, 1159, 2166, 2015, 2070, y 3059 ([Hayashi et al, 2007](#)). En nuestro análisis de estas regiones por electroforesis bidimensional se detectaron 2 ORIs meióticos que colocalizaban con los sitios 1-3 y 3-5 no predichos como ORIs mitóticos ni por su contenido en A+T ni por la unión de ORC. Además, en el caso del sitio 1-4 se comprobó que el ORI es activo durante la fase S premeiótica pero no durante el ciclo mitótico, a pesar de que había sido descrito como ORI mitótico en los dos trabajos citados anteriormente (**FIGURA 12**).

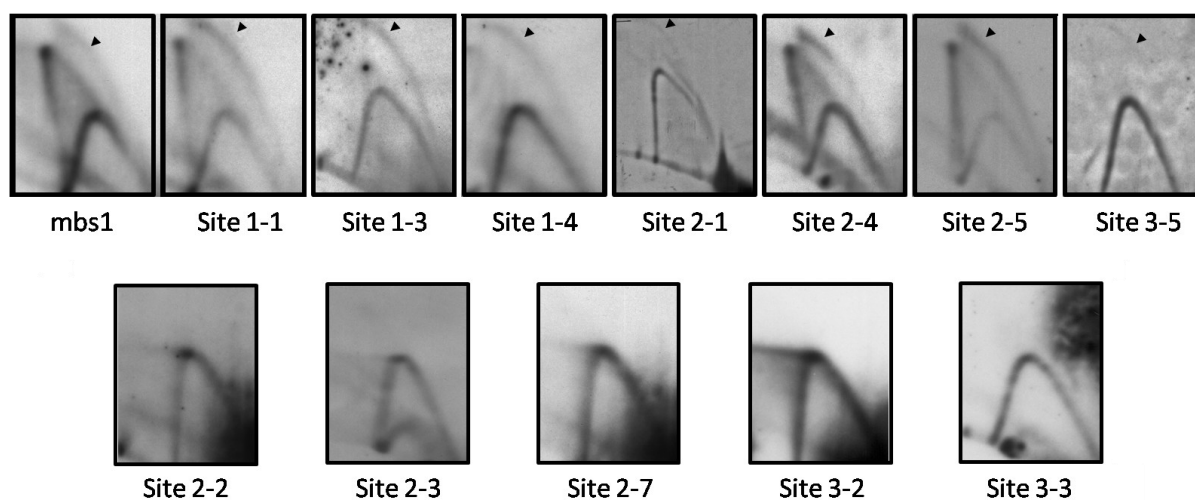


Fig.11 Análisis por electroforesis bidimensional de 13 regiones intergénicas que contienen sitios de DSBs (ver **FIGURA 8**). En la parte superior se muestran ocho regiones en las que aparecen señales correspondientes a burbujas de replicación (señaladas con flechas) y por lo tanto colocalizan con ORIs activos. Las imágenes inferiores corresponden a las cinco regiones en las que sólo se detectan horquillas de replicación pasiva en la muestra de 1 hora 15 minutos (ver **FIGURA 10**).

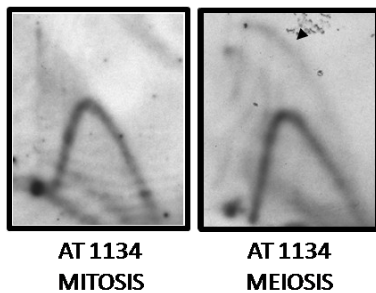


Fig.12 Análisis por electroforesis bidimensional de la región que contiene la isla AT 1134 en mitosis y meiosis. En un cultivo mitótico asincrónico sólo se observa la señal de horquillas de replicación correspondiente a una región que se replica pasivamente. En meiosis se observa arco activo (flecha). En este caso el DNA se obtuvo durante la fase S premeiótica de un cultivo sincrónico en meiosis (1h 15min) (FIGURA 10).

Estos resultados indicaban que aproximadamente el 61% de las regiones con DSBs descritas previamente por otros autores colocalizaban con ORIs meióticos. La identificación de un ORI exclusivamente meiótico de un total de 8 analizados sugería la posibilidad de que existiese una fracción de ORIs específicos de cada tipo de fase S.

1.3 DETECCIÓN DE ROTURAS MEIÓTICAS EN REGIONES QUE CONTIENEN ISLAS AT

En la sección anterior se comprobó experimentalmente que el 61% de los sitios de DSBs colocalizaban con ORIs meióticos. Pero esos resultados no daban información sobre la correlación inversa, es decir, si el porcentaje de ORIs que colocalizaba con DSBs era también más elevado que el predicho en base a los mapas genómicos de ORIs y DSBs en el apartado 1.1 de Resultados. Para analizar esa correlación, se analizó la presencia de DSBs durante la fase S premeiótica en 8 regiones predichas como ORIs por su colocalización con islas AT. En todas estas regiones se comprobó previamente por electroforesis bidimensional que eran ORIs activos en meiosis y también en mitosis (FIGURA 13).

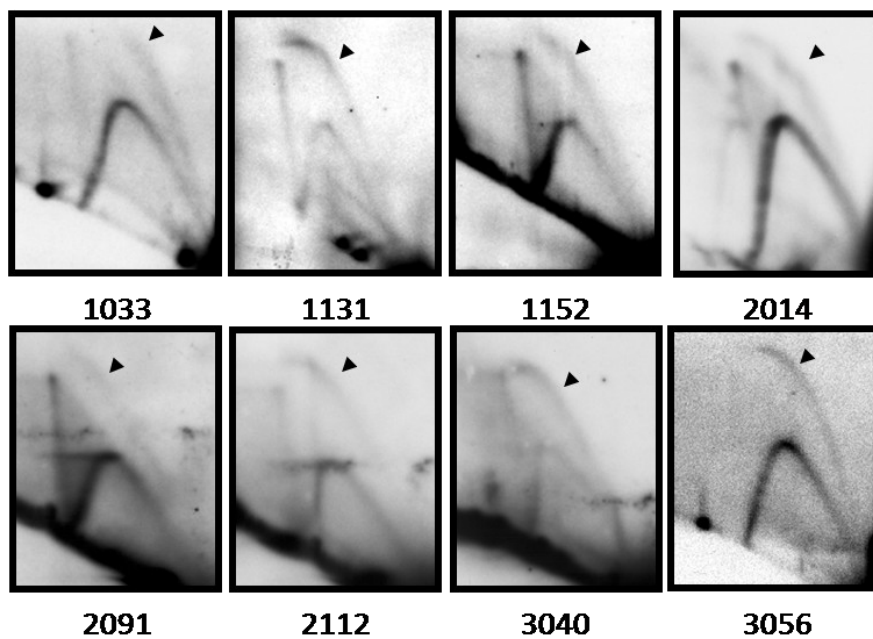
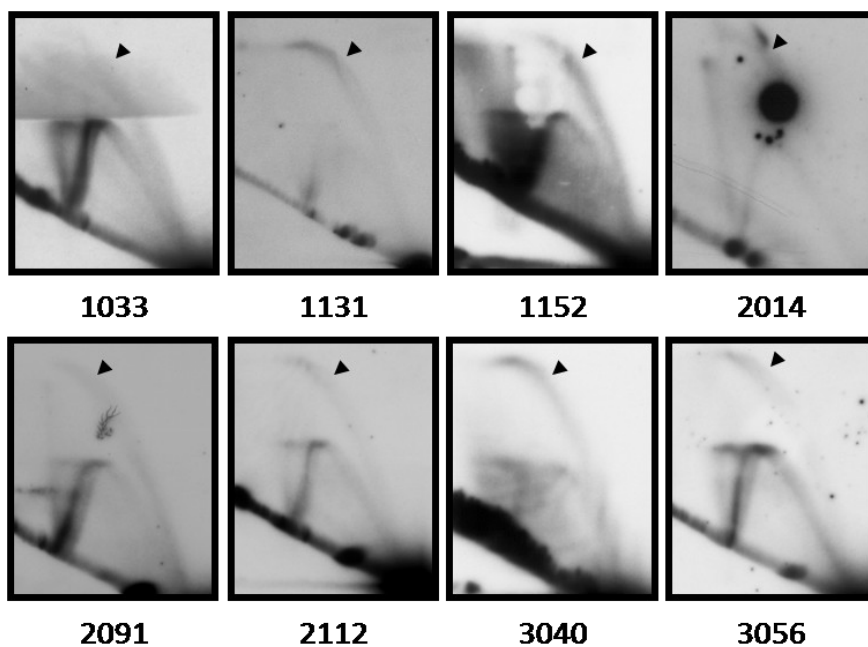
MITOSIS:**MEIOSIS:**

Fig.13 Análisis por electroforesis bidimensional en mitosis y meiosis de 8 regiones del genoma que contenían islas AT. En todas ellas se pudo comprobar que los ORIs son activos en las dos fases S. Las flechas muestran las señales correspondientes a las burbujas de replicación.

Para el análisis de DSBs en las 8 regiones, el DNA se extrajo en *plugs* de agarosa (ver apartado 8 de Materiales y métodos) ya que otros métodos podían resultar demasiado agresivos y causar roturas de doble cadena en el DNA debidas al tratamiento de extracción. Se tomaron muestras del cultivo creciendo en fase exponencial y a las 0, 2.5, 3, 3.5, 4.5 y 6 horas después de haber comenzado la meiosis. Los DSBs deberían observarse en las muestras tomadas durante la recombinación meiótica (que tiene lugar entre las 2.5 y 3.5 horas) cuando ya ha terminado la replicación del DNA (ver FIGURA 10) mientras que no serían observables en las muestras de 4.5 y 6 horas porque ya se habrían reparado, ni en la muestra de tiempo 0, en la cual las células están paradas en fase G1 y todavía no se ha iniciado la meiosis sincrónica. En la muestra recogida del cultivo en fase exponencial tampoco se esperaría la aparición de roturas, ya que se trata de un cultivo mitótico.

El análisis de las 8 regiones de la FIGURA 13 nos permitió detectar cinco regiones de DSBs que colocalizaban con las islas AT 2014, 2091, 2112, 3040 y 3056 (FIGURA 14). En las tres regiones restantes, las islas AT 1033, 1131, 1152 no se detectó la presencia de DSBs.

Rec12 es la endonucleasa que introduce los DSBs en el DNA durante la meiosis. En el trabajo llevado a cabo por Cromie et al (2007) se estudió la distribución global de DSBs en *S. pombe* mediante la inmunoprecipitación de cromatina de un mutante *Rec12-FLAG rad50S*. Se utilizaron *tiling microarrays* que permitieron detectar la señal de DNA unido a Rec12 a lo largo de todo el genoma (ver apartado 4.2 Introducción). En nuestro análisis, para comprobar de forma rigurosa si los ORIs activos colocalizaban con DSBs, seleccionamos 4 (1033, 1131, 1152 y 2112) que no habían sido identificados como sitios de unión de Rec12 por Cromie et al (2007). Sólo uno, la isla AT 3056 se encontraba en la misma región intergénica que un sitio de unión de Rec12 descrito por Cromie et al (2007). En el caso de 2014, 2091 y 3040 se detectaban señales de Rec12 a menos de 2 kb del ORI. A continuación analizamos experimentalmente si los DSBs que aparecían en las islas AT 2014, 2091, 2112, 3040 y 3056 durante la recombinación meiótica eran dependientes de la proteína Rec12. Para esto se llevó a cabo el mismo análisis de DSBs en *plugs* de agarosa descrito anteriormente en un mutante $\Delta rec12$, en el que se había sustituido la ORF completa del gen *rec12*⁺ por el marcador *KanMX4*, que confiere a las células capacidad de resistencia al antibiótico geneticina (ver apartado 2.2 de Materiales y métodos). Como se observa en la FIGURA 14, en las cinco regiones se confirmó la dependencia de estas roturas de la presencia de Rec12.

Los DSBs detectados en la isla AT 2112 constituían un sitio nuevo de roturas meióticas dependientes de la proteína Rec12 que no habían sido encontrados previamente por otras técnicas.

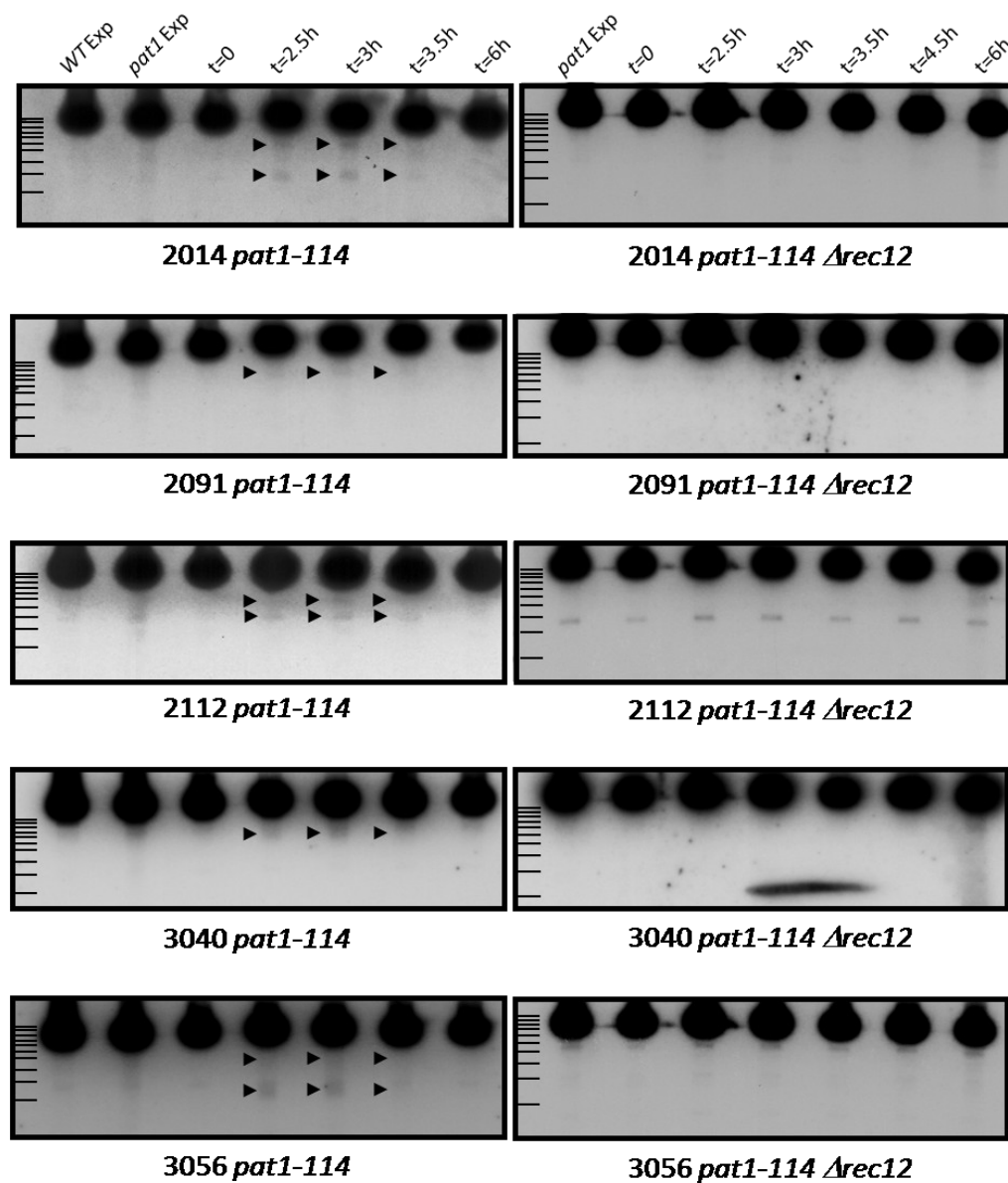


Fig.14 Análisis por *Southern Blot* de DNA en *plugs* de agarosa de cinco regiones del genoma que contenían islas AT y se comportaban como ORIs activos en mitosis y meiosis. En la columna de la izquierda se muestra el análisis de la cepa *pat1-114* y en la derecha el análisis de las mismas regiones en un mutante *pat1-114* Δ *rec12*.

La localización de un sitio de DSBs no detectado previamente mediante la unión de Rec12 asociado a un origen de replicación, indica que la colocación de ORIs con sitios de DSBs es superior al 36.5% detectado en el análisis genómico global del apartado 1.1.

2. ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA FUNCIONAL ENTRE LA ACTIVIDAD DEL ORIGEN DE REPLICACIÓN AT 1034 Y LA GENERACIÓN DE DSBs EN *mbs1*

Tras el análisis de la colocalización de ORIs y DSBs meióticos, nos planteamos el estudio de la posible dependencia funcional entre la activación de los orígenes de replicación y la correcta formación de los DSBs en dos regiones concretas del genoma. En *S. cerevisiae* se había comprobado que cuando una región del cromosoma III se replicaba de forma tardía durante la fase S premeiótica, los DSBs en esa región también sufrían un retraso en su aparición (Borde et al, 2000).

Llevamos a cabo nuestro estudio en dos regiones del genoma de *S. pombe*. En una de ellas, la región intergénica que contenía el *hotspot* de recombinación *mbs1* (Young et al, 2002), en el cromosoma I, también existía un ORI meiótico, la isla AT 1034, de manera que en este *locus* ambos procesos colocalizaban de forma natural. La otra región elegida para nuestro estudio (apartado 3 de Resultados) fue la región intergénica adyacente al *locus* del gen *rhp7⁺* en el cromosoma III, donde originalmente no existía ningún ORI ni DSBs, de manera que podíamos integrar diversas secuencias de DNA y estudiar cuáles eran los requerimientos necesarios para la formación de ORIs y DSBs.

El sitio de recombinación meiótica natural mejor estudiado en *S. pombe* es *mbs1*, que consta de cuatro grupos de DSBs a lo largo de 2.1 kb (FIGURA 15A). Además se ha comprobado su actividad como *hotspot* de conversión génica y de *crossing-over* (Cromie et al, 2005).

Uno de los puntos de partida de este análisis se basó en la observación de que el origen de replicación asociado a la isla AT 1034 se encontraba en la misma región intergénica que *mbs1* (FIGURA 15A). El objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar si existía alguna influencia de la actividad del origen de replicación AT 1034 sobre la formación de las roturas meióticas en esta región y viceversa, es decir, si la presencia de la endonucleasa Rec12 determinaba una eficiente activación del origen de replicación en este *locus*, aunque la generación de DSBs es posterior a la replicación del DNA.

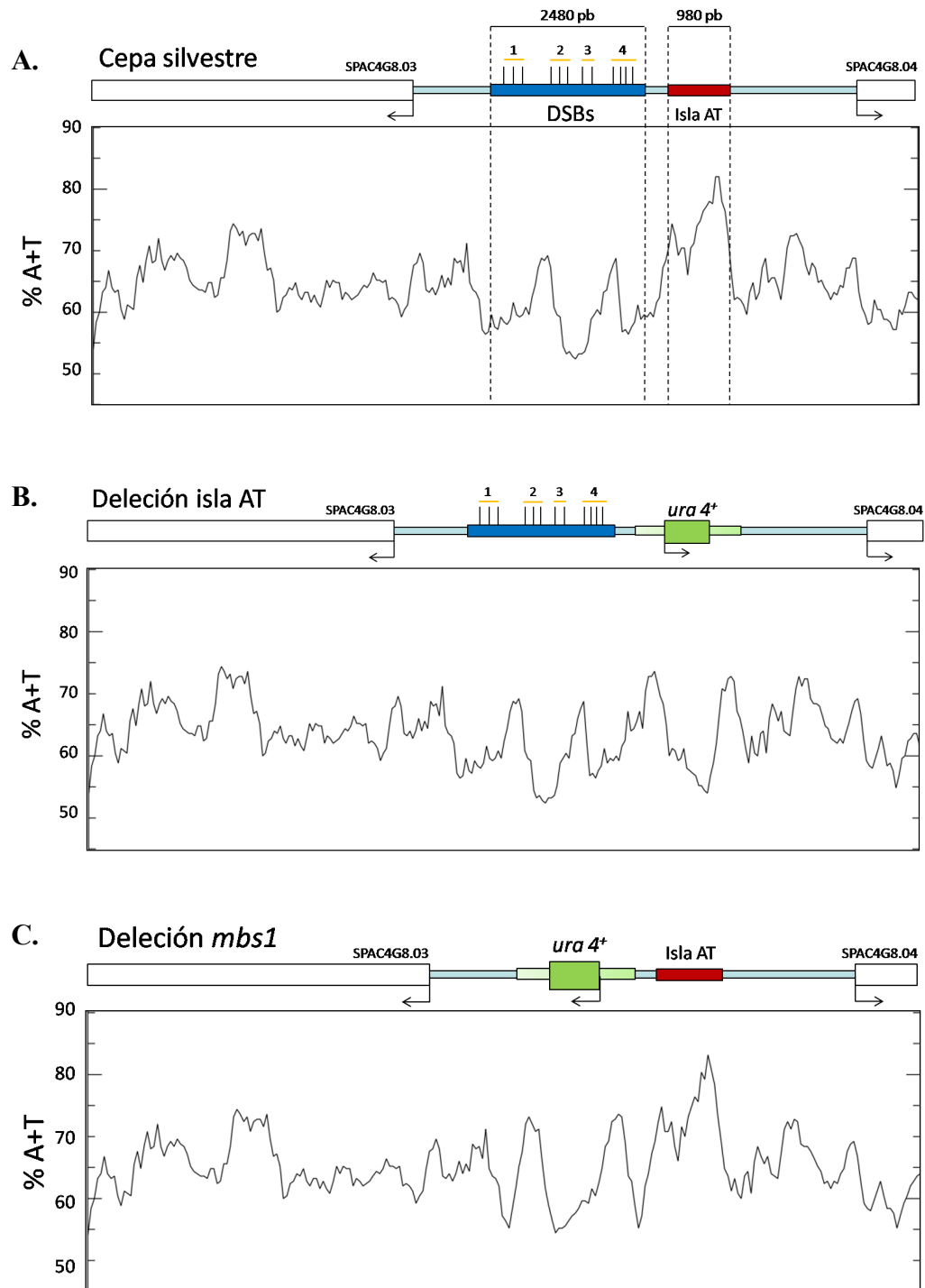


Fig.15 Mapas de la región *mbs1* y de las delecciones del ORI y los DSBs. El perfil de contenido en A+T se representa en ordenadas y se calculó en ventanas de 250 pb y paso de 50 pb. Los genes se indican con rectángulos blancos y su transcripción es divergente, como muestran las flechas. **A.** Mapa de la cepa silvestre. La región con contenido A+T más elevado y señalada en rojo en el mapa es la isla AT 1034. Los grupos de DSBs (1 - 4) se señalan con líneas amarillas sobre líneas verticales (región azul). **B.** Mapa de la cepa en la que se sustituyó la región de 980 pb que incluía la isla AT por el fragmento de 1.7 kb que contenía el gen marcador *ura4⁺*. **C.** Mapa de la cepa en la que se sustituyó la región de 2480 pb que contenía los DSBs por el gen marcador *ura4⁺*.

Como se observa en el mapa de la **FIGURA 15A** el ORI AT 1034 y los DSBs se encontraban en secuencias adyacentes en la misma región intergénica, lo cual nos permitía delecionar la isla AT 1034 manteniendo intacta la zona en la que se habían localizado los DSBs y viceversa, podíamos delecionar la región de DSBs sin modificar la región de la isla AT. Por último utilizaríamos una cepa sin la proteína Rec12, que es la endonucleasa encargada de la formación de los DSBs, para saber si la total ausencia de DSBs en la célula afectaba a la replicación tanto en este *locus* como en el resto del genoma.

En primer lugar analizamos la activación del origen de replicación en meiosis y la formación de DSBs en el *locus mbs1* en la cepa silvestre. Al igual que en los experimentos descritos en el apartado 1 de Resultados, indujimos la meiosis sincrónica en la cepa *pat1-114* mediante un cambio de temperatura y la adición de nitrógeno al medio tras la parada de las células en G1 (**FIGURA 10**). Después de la inducción de la meiosis, la fase S premeiótica se producía entre 1 h y 3 h y la formación de DSBs entre 2 h 30 min y 3 h 30 min. Para el análisis de la actividad del ORI los intermediarios de replicación se examinaron en muestras de DNA a tiempo 1 h 15 min, cuando empezaba la fase S premeiótica. El DNA se purificó mediante gradientes de CsCl (ver apartado 7.1 de Materiales y métodos), se digirió con el enzima de restricción XmnI y se sometió a electroforesis bidimensional. La hibridación nos permitió observar señales correspondientes a burbujas de replicación (arco activo) en la cepa silvestre (**FIGURA 16**) lo cual indicaba que la isla AT 1034 era un ORI activo en meiosis.

Para el análisis de DSBs se extrajo el DNA en *plugs* de agarosa, se digirió con el enzima NcoI y se hibridó con una sonda radiactiva correspondiente al extremo izquierdo (telómero proximal) del fragmento de restricción (**FIGURA 16A**). En la cepa silvestre se observaron, además de la banda correspondiente al fragmento NcoI intacto (8.1 kb), bandas de menor tamaño causadas por DSBs. Los DSBs se observaron únicamente en las muestras tomadas durante el periodo de recombinación meiótica, entre 2 h 30 min y 3 h 30 min y no aparecían en la muestra de fase exponencial o en el tiempo 0 de meiosis ni a las 6 h del comienzo de la meiosis, momento en el que ya se habían reparado (**FIGURA 16B**).

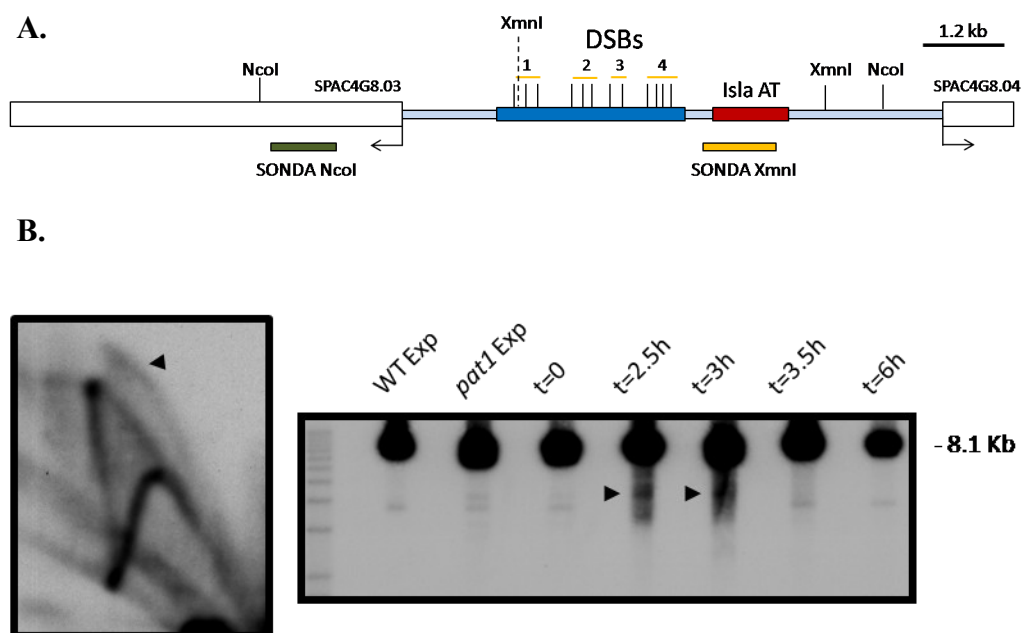


Fig.16 A. **Mapa de la región *mbs1* en la cepa silvestre.** Los genes están representados por rectángulos blancos y la flecha negra fina representa el inicio de la ORF. En la región intergénica se señala la región de DSBs (con los grupos de DSBs 1-4) con un rectángulo azul. La isla AT 1034 se indica con un rectángulo rojo. Para el análisis de la actividad ORI se hibridó el fragmento XmnI con la sonda marcada por un rectángulo amarillo. Los DSBs se analizaron en una digestión NcoI con la sonda indicada en color verde. B. **Electroforesis bidimensional y Southern blot.** En la parte izquierda se muestra el análisis por electroforesis 2D del fragmento XmnI que contenía la isla AT 1034 en la cepa silvestre. La flecha negra gruesa muestra la señal correspondiente a las burbujas de replicación. En la derecha, el DNA en *plugs* de agarosa digerido con NcoI e hibridado con la sonda verde en el mapa. Los DSBs se observaron en las muestras tomadas 2.5 h y 3 h después de la inducción de la meiosis sincrónica.

2.1 DELECIÓN DE LA ISLA AT 1034

Para el estudio de la posible influencia de la actividad del ORI sobre la formación de DSBs construimos una cepa en la que se reemplazaron 980 pb que incluían la isla AT 1034 por un fragmento de 1.7 kb que contenía el gen marcador *ura4⁺*, manteniendo intacta la región de 2.1 kb con los DSBs (FIGURA 17A). Para ello diseñamos dos casetes de 250 pb de homología con las regiones que flanqueaban estos 980 pb. Estos casetes se clonaron en un plásmido flanqueando los dos extremos del fragmento de 1.7 kb que contenía el gen *ura4⁺*. La construcción se separó del plásmido por digestión con los enzimas de restricción apropiados y se transformaron dos cepas

haploides de la levadura con este fragmento de DNA lineal. Las cepas de *S. pombe* *pat1-114* construidas para el experimento debían ser diploides ya que la meiosis sincrónica no se producía tras la conjugación de dos células haploides de distinto tipo sexual, como en una cepa silvestre, sino tras una parada en G1 en ausencia de nitrógeno de una cepa diploide *pat1-114* (FIGURA 10). De manera que construimos en primer lugar las cepas haploides, de tipo sexual h^- con diferentes mutaciones en el gen *ade6* en cada una de ellas: *ade6M210* y *ade6M216*. Una vez obtenidos los transformantes haploides, se construyó la cepa diploide por fusión de protoplastos (ver apartado 4 de Materiales y métodos). Los diploides se seleccionaron por complementación de la auxotrofia para el aminoácido adenina (h^-/h^- 1034::*ura4*⁺/1034::*ura4*⁺ *pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*).

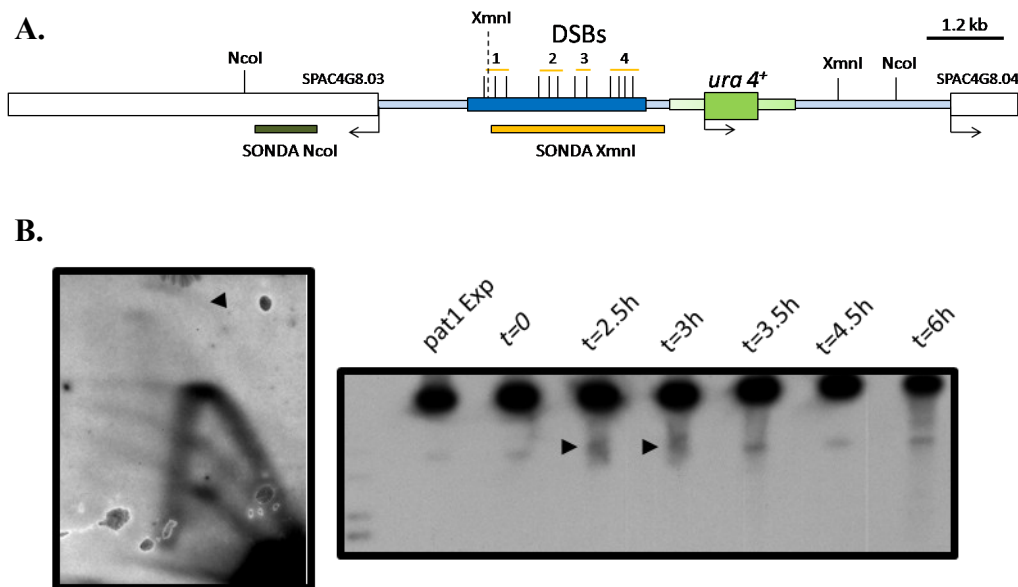


Fig. 17 **A. Mapa de la región *mbs1* con la delección de la isla AT 1034.** En la región intergénica se señala la región de DSBs con un rectángulo azul. La isla AT 1034 se sustituyó por el gen marcador indicado en verde. Para el análisis de la actividad ORI se hibridó el fragmento *XmnI* con la sonda indicada con un rectángulo amarillo. Los DSBs se analizaron en una digestión *NcoI* con la sonda indicada en color verde oscuro. **B. Análisis por electroforesis bidimensional y Southern blot.** En la parte izquierda de la figura se muestra el análisis por electroforesis 2D del fragmento *XmnI* hibridado con la sonda en amarillo en el mapa. La flecha negra muestra la señal correspondiente a las burbujas de replicación. En la parte derecha, se muestran con flechas negras los DSBs en las muestras tomadas a las 2.5 h y 3 h de la inducción de la meiosis sincrónica.

Tras el análisis por electroforesis bidimensional comprobamos que la delección de la región más rica en A+T no abolía por completo la actividad del origen de replicación. Como se observa en la FIGURA 17B, la señal correspondiente a la presencia de burbujas de replicación (flecha negra) indicaba que el origen de replicación era activo a pesar de haber perdido eficiencia respecto al ORI silvestre. La eficiencia del ORI se pudo estimar de manera cualitativa comparando la intensidad de la señal del arco pasivo respecto al activo. Esta proporción permite relacionar el número de células en las que este fragmento del genoma se está replicando como consecuencia de la actividad de un ORI adyacente (arco pasivo) respecto a las células en las que se inicia la replicación en esta región (arco activo). En este caso y en comparación con la cepa silvestre (FIGURA 16B), el arco activo había perdido mucha intensidad respecto al pasivo.

A continuación quisimos ver si esta pérdida de eficiencia del ORI afectaba a la formación de los DSBs en esta región. Para ello tomamos muestras de DNA en *plugs* de agarosa durante una meiosis sincrónica y analizamos la formación de DSBs. La hibridación mostró que sí se generaban DSBs (FIGURA 16B y 17B) lo cual indicaba que una disminución en la eficiencia del ORI adyacente en la fase S, previa al inicio de la recombinación, no afectaba a la correcta formación de los DSBs en esa región.

2.2 DELECCIÓN DE LA REGIÓN DE 2.4 kb QUE CONTENÍA EL *HOTSPOT* DE RECOMBINACIÓN *mbs1*

El *hotspot* de recombinación natural *mbs1* se encuentra adyacente a la isla AT 1034 y los DSBs se extienden a lo largo de 2.1 kb en la misma región intergénica que el ORI. El hecho de que ambos procesos se produjeran en la misma región intergénica pero no en la misma secuencia sino en secuencias adyacentes, nos permitió llevar a cabo la delección del ORI y de los DSBs por separado en diferentes cepas de *S. pombe* para comprobar si existía una dependencia funcional entre ambos fenómenos.

En este caso, se delecionaron 2.4 kb que contenían los DSBs. La finalidad de esta parte del estudio era saber si eran necesarias las secuencias sobre las que se producían los DSBs o si podrían generarse sobre otras que las reemplazasen en el mismo lugar. También queríamos estudiar si la supresión de la región en la que se producían los DSBs podría afectar a la activación del origen de replicación.

Para ello se reemplazó la región de 2.4 kb donde se habían localizado los DSBs de *mbs1* por un fragmento de 1.7 kb que contenía el gen marcador *ura4⁺* flanqueado por los casetes de recombinación homóloga dirigidos a esa región del genoma. Las cepas haploides se construyeron como en el caso anterior y los diploides se obtuvieron por fusión de protoplastos. El genotipo de la cepa diploide fue: *h⁻/h⁻ mbs1::ura4⁺/mbs1::ura4⁺ pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*.

El *Southern blot* de DNA en *plugs* de agarosa mostró que en esta cepa no se producían DSBs sobre la secuencia del gen marcador, aunque sí se observaba una banda cercana al fragmento intacto (flechas negras en los carriles de 2 h 30 min y 3 h en la imagen derecha de la FIGURA 18B). Esta banda correspondía a DSBs generados en la parte opuesta a la sonda utilizada del fragmento *NcoI* (FIGURA 18A) y más tarde comprobamos con diferentes digestiones que también se producían en la cepa silvestre, aunque en ésta eran casi imperceptibles debido a la intensidad de los DSBs de *mbs1* (datos no presentados). La desaparición de los DSBs de su localización natural en la cepa con el gen *ura4⁺* sustituyendo la secuencia de *mbs1* podría explicarse de dos maneras. Una posibilidad era que la región delecionada incluyera una secuencia necesaria para la unión de Rec12, la endonucleasa que genera los DSBs. Otra posibilidad era que la transcripción del gen marcador *ura4⁺* impidiera la unión de Rec12 o la generación de DSBs, dado que el crecimiento del cultivo en medio mínimo para la correcta progresión de la meiosis sincrónica hacía que la transcripción del gen *ura4⁺* fuera necesaria para la supervivencia de la célula.

El análisis mediante electroforesis bidimensional de la actividad del ORI reveló que ésta permanecía inalterada respecto a la de la cepa silvestre (FIGURA 18B) lo que indicaba que la correcta formación de las roturas no era esencial para la actividad del ORI adyacente.

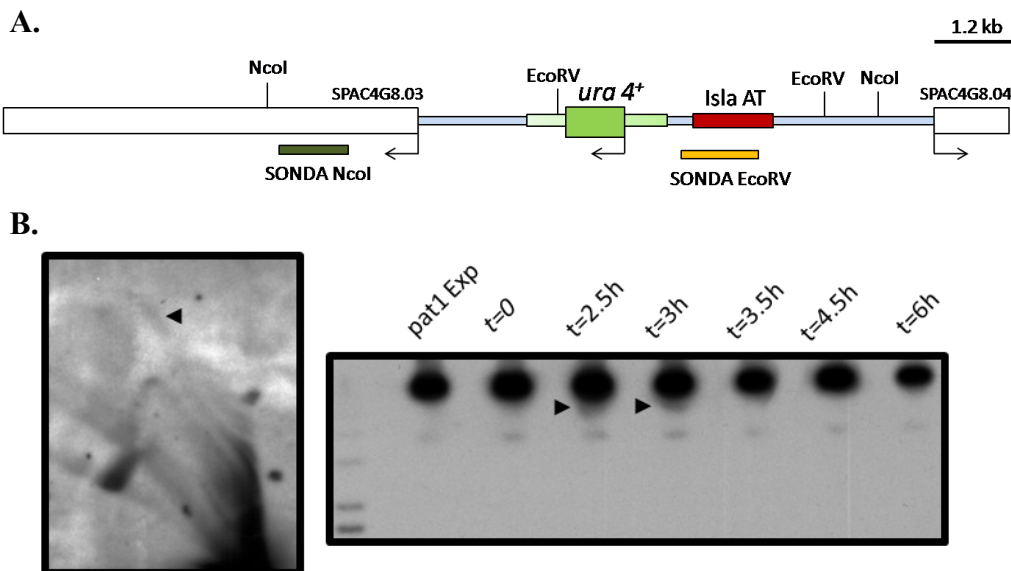


Fig. 18 **A.** Mapa de la región *mbs1* con la delección de los DSBs. El gen marcador *ura4⁺* está representado en verde y la isla AT 1034 en rojo. Para el análisis de la actividad ORI se hibridó el DNA digerido con *EcoRV* con la sonda en amarillo. Para el análisis de los DSBs se hibridó el DNA digerido con *NcoI* con la sonda verde oscuro. **B.** Análisis por electroforesis bidimensional y *Southern blot*. En la parte izquierda de la figura se muestra el análisis por electroforesis 2D del fragmento *EcoRV* hibridado con la sonda en amarillo en el mapa. La flecha negra muestra la señal correspondiente a las burbujas de replicación. En la parte derecha, se muestran con flechas negras los DSBs en las muestras tomadas a las 2.5 h y 3 h de la inducción de la meiosis sincrónica.

2.3 INTEGRACIÓN DE DOS REGIONES INTERGÉNICAS ECTÓPICAS EN EL SITIO *mbs1*

Como comentábamos en el apartado anterior, la sustitución de la secuencia de 2.4 kb que contenía los DSBs de *mbs1* por el gen marcador *ura4⁺* supuso la desaparición de los DSBs en ese sitio del genoma. Esto podría ser debido a la existencia de una secuencia en la región delecionada necesaria para la unión de la proteína Rec12. Otra posibilidad podría ser que la transcripción del gen marcador *ura4⁺* impidiera la unión de Rec12 a esa región aunque no necesitara una secuencia específica para hacerlo. Esta segunda posibilidad concordaría con las conclusiones del trabajo de [Cromie et al \(2007\)](#) en el que se localizaron los sitios del genoma a los que se une Rec12 mediante inmunoprecipitación de cromatina en una cepa *Rec12-FLAG rad50S*. Los lugares en los que detectaron señales de unión de Rec12 al DNA carecían de una secuencia consenso y la única característica común a todos ellos era que se trataba de regiones intergénicas grandes.

A partir de estos datos nos planteamos como siguiente objetivo de este trabajo la sustitución de la región de 2.4 kb que contenía los DSBs en *mbs1* por una región intergénica no codificante y que no se transcribía, procedente de otra parte del genoma, donde además no se generaban DSBs en meiosis. Esta integración nos permitiría distinguir si era la secuencia o el tamaño de la región intergénica libre de transcripción lo que permitía la unión de la proteína Rec12 al DNA y la formación de los DSBs.

Para realizar el ensayo por duplicado, elegimos dos regiones diferentes del genoma que habíamos comprobado en trabajos anteriores en nuestro laboratorio que no contenían orígenes de replicación en el genoma en cultivos asincrónicos en mitosis (**FIGURA 19B**) ni tampoco actuaban como ARS en plásmido. Se denominaron C5 y R3. C5 era una región intergénica de 1908 pb y 69.4% A+T que se encontraba entre los genes *cdc25⁺* y *hxl1⁺* y R3 era una región intergénica de 1500 pb y 68.8% A+T que se encontraba entre los genes *rad17⁺* y *atp1⁺*. Ambas se localizaban en el cromosoma I. Como control previo analizamos la presencia de DSBs durante la recombinación meiótica en ambos sitios del genoma (**FIGURA 19C**) y observamos que en ninguno de ellos se generaban DSBs.

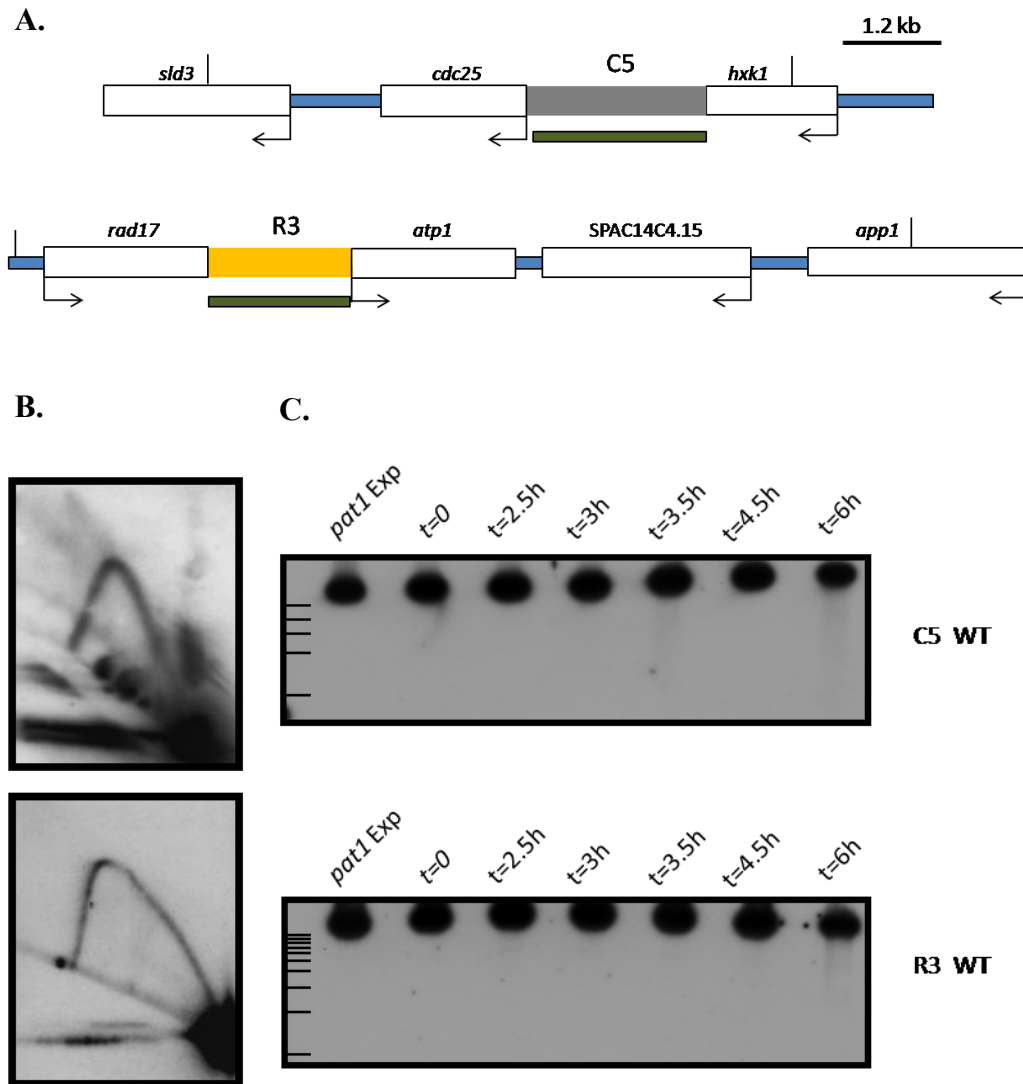


Fig.19 **A.** Mapas de las regiones C5 y R3 en su locus silvestre. Los genes se indican con rectángulos blancos y las flechas muestran el inicio de las correspondientes ORFs. Las líneas verticales indican los fragmentos de restricción analizados por *Southern blot* para el análisis de DSBs y las sondas utilizadas se muestran con rectángulos verdes. **B.** Análisis por electroforesis bidimensional de las regiones C5 y R3 en mitosis en su locus genómico realizados por Gomez & Antequera (1999) y Segurado et al (2002). El resultado de la hibridación mostró solamente señales correspondientes a horquillas de replicación. **C.** Análisis por *Southern blot* de las regiones C5 y R3 en su locus genómico. Se comprobó que no había DSBs durante la recombinación meiótica en estas regiones.

Se partió de las cepas haploides en las que se había sustituido la región de 2.4 kb de *mbs1* por el gen marcador *ura4⁺* en una cepa inicial *ura⁻* (FIGURA 15C). Los fragmentos que contenían C5 y R3 se flanquearon con los casetes de recombinación homóloga dirigidos a esa región del genoma y se transformaron las cepas receptoras (*ura⁺*). Se seleccionaron las colonias transformantes, que debían ser auxótrofas para uracilo, en medio mínimo suplementado con uracilo y 1g/L de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) ya que este compuesto es tóxico para las células que mantienen íntegra la ruta de síntesis del uracilo (ver apartado 2.2 de Materiales y métodos). A continuación se llevó a cabo una segunda transformación en la que se integró el gen *ura4⁺* en su *locus* endógeno en cada una de las cepas. Este paso fue necesario ya que en las cepas auxótrofas para uracilo no era posible la parada de las células en G1 necesaria para la posterior meiosis sincrónica. Los diploides se obtuvieron por fusión de protoplastos. Los genotipos de las cepas construidas fueron: *h⁻/h⁻ mbs1::C5/mbs1::C5 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216* y *h⁻/h⁻ mbs1::R3/mbs1::R3 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*.

Analizamos en ambas cepas la presencia de DSBs en el fragmento que contenía la región intergénica correspondiente a *mbs1* y pudimos comprobar que se formaban DSBs en ambos casos (FIGURA 20B). Este resultado nos permitía concluir que la secuencia de *mbs1* no era necesaria para la formación de DSBs en esa región.

En la FIGURA 21 se muestran los mapas de todas las integraciones llevadas a cabo en la región *mbs1* en este trabajo.

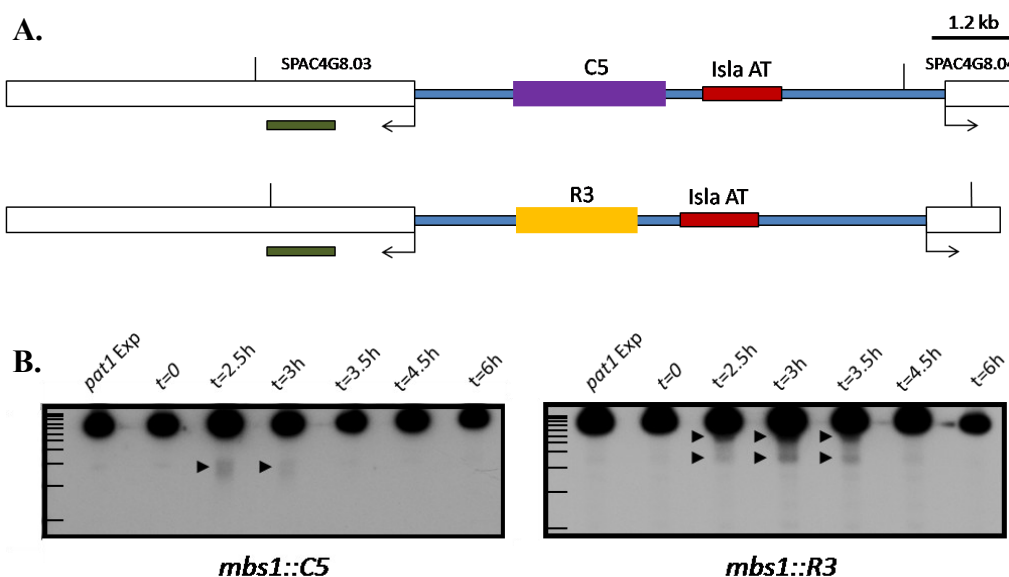


Fig.20 A. Mapas de la región *mbs1* tras la integración de los fragmentos C5 y R3. Los genes se indican con rectángulos blancos y las flechas muestran el inicio de la transcripción. Las líneas verticales indican los fragmentos de restricción analizados por *Southern blot* para el análisis de DSBs y las sondas utilizadas se muestran con rectángulos verdes. B. *Southern blot* de las regiones C5 y R3 en la región *mbs1*. El análisis reveló la presencia de DSBs durante la recombinación meiótica en estas regiones.

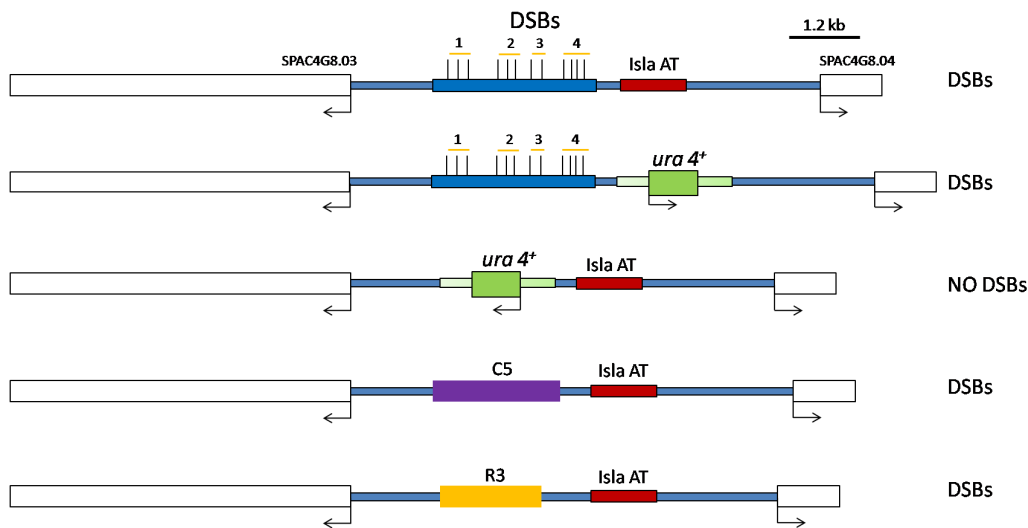


Fig.21 **Resumen de las integraciones llevadas a cabo en la región *mbs1*.** Mapa de la región *mbs1* en la cepa silvestre y en las cepas construidas para el trabajo descrito en este apartado de los Resultados. A la derecha se indica si en la cepa correspondiente se encontraron DSBs en esta región.

2.4 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ORI EN UN MUTANTE $\Delta rec12$

Rec12 es una proteína esencial para la formación de las roturas meióticas. Es la subunidad catalítica que introduce las roturas en el DNA. Rec12 es ortólogo a la subunidad A de la Topoisomerasa VI de *Archaea*. La proteína se une covalentemente al extremo 5' del DNA roto por un residuo de tirosina (Tyr-98). Esta unión es necesaria para su acción endonucleasa, los mutantes en esta tirosina son deficientes en recombinación meiótica (Cervantes et al, 2000). En el estudio del fenotipo de este mutante se comprobó que la fase S premeiótica progresaba igualmente en las cepas $\Delta rec12$, $\Delta rec6$ y WT por incorporación de uracilo marcado con H^3 . Pero los transcritos de $rec12^+$ aparecían a las 2h del comienzo de la meiosis sincrónica en una cepa *pat1-114*, cuando la replicación del DNA todavía se estaba produciendo (Lin & Smith, 1994). Así que nosotros quisimos comprobar si en una región intergénica donde ambos fenómenos coexistían, como *mbs1* y la isla AT 1034, la ausencia total de Rec12 podría afectar a la correcta activación del origen de replicación. Se utilizó una cepa en la que se había delecionado el gen $rec12^+$ sustituyendo su secuencia mediante recombinación homóloga por la del gen marcador *kan⁺* ($h/h \Delta rec12::KanMX4/\Delta rec12::KanMX4 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216$).

En un primer paso analizamos la progresión de la meiosis sincrónica con la finalidad de examinar si la fase S premeiótica se producía al mismo tiempo en la cepa *pat1-114Δrec12* que en la cepa *pat1-114*. Los cultivos se sincronizaron como describíamos en los apartados anteriores y se tomaron muestras que se analizaron por citometría de flujo, tal como se describe en el apartado 6 de Materiales y métodos. El resultado mostró que la fase S premeiótica se producía al mismo tiempo en ambas cepas, entre 1 y 2 h después de la inducción de la meiosis (FIGURA 22).

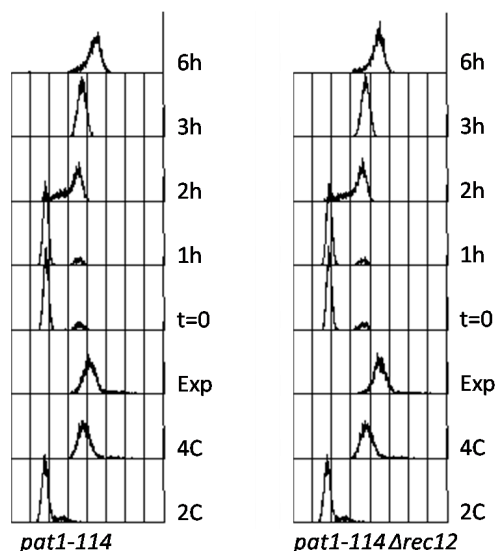


Fig.22 **Análisis de FACS de meiosis sincrónica de las cepas *pat1-114* y *pat1-114Δrec12* de *S. pombe*.** En ambas cepas la replicación del DNA durante la fase S premeiótica se produce entre 1 h y 3 h después de la inducción de la meiosis.

Por último se analizó por electroforesis bidimensional la activación del ORI adyacente a los DSBs de la región *mbs1*. Este análisis, en concordancia con los resultados anteriores, mostró que la activación del ORI es idéntica en ausencia de Rec12 y en la cepa silvestre (FIGURA 23). Estos resultados nos permitieron afirmar que la proteína Rec12 no es necesaria para una correcta activación de los ORIs de fase S premeiótica, lo cual es compatible con el hecho de que la replicación sea un proceso previo a la formación de roturas de doble cadena.

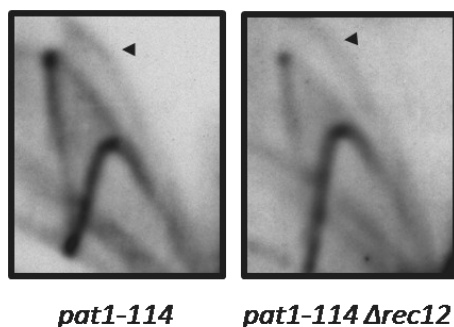


Fig. 23 **Análisis por electroforesis 2D de la isla 1034 en las cepas *pat1-114* y *pat1-114Δrec12*.** Las muestras se tomaron 1 h 15 min después del comienzo de la meiosis sincrónica. Las flechas negras indican la señal correspondiente a los arcos de burbuja.

A pesar de la alta tasa de colocación genómica de DSBs y ORIs (60%) este apartado del trabajo nos permitió concluir que no existe una dependencia funcional entre la activación de los orígenes de replicación en la fase S premeiótica y la correcta formación de los DSBs en *S. pombe*. La disminución de la eficiencia de un ORI adyacente no afecta a la formación de roturas en una misma región intergénica, como demuestra la delección de la isla AT 1034. Asimismo, cuando abolimos los DSBs de *mbs1* no se afecta la actividad del ORI adyacente. Este último resultado es consistente con la observación de que en un mutante $\Delta rec12$ no se ve afectada la fase S premeiótica a nivel genómico ni la activación del ORI AT 1034.

Además observamos que la secuencia de 2.1 kb donde se producen los DSBs de la región *mbs1* no es necesaria para la generación de estas roturas. Solamente la existencia de una región libre de transcripción del mismo tamaño que la silvestre era requisito suficiente para la formación de roturas meióticas en ese *locus*.

3. ESTUDIO DE LOS REQUERIMIENTOS NECESARIOS PARA LA GENERACIÓN DE ROTURAS MEIÓTICAS

Para el análisis funcional de los requerimientos necesarios para la formación de DSBs en una región concreta del genoma, elegimos la región intergénica adyacente al *locus* del gen *rhp7⁺* en el cromosoma III, donde no existía ningún ORI ni DSBs en la cepa silvestre. El objetivo de este apartado era intentar generar ambos procesos artificialmente integrando diversas secuencias, para poder estudiar cuáles eran capaces de generar ORIs y sitios de rotura.

3.1 EL CONTEXTO GENÓMICO DETERMINA LA ACTIVACIÓN DE UN ORI Y LA FORMACIÓN DE DSBs DEPENDIENTES DE Rec12

El único mapa de orígenes de replicación meióticos publicado hasta la fecha fue realizado por [Heichinger et al \(2006\)](#). Una de las conclusiones de ese trabajo fue que los ORIs utilizados por la célula en meiosis y mitosis eran los mismos, aunque con distintas eficiencias. Sin embargo, en estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio habíamos descubierto que algunos orígenes de replicación se activaban sólo durante el ciclo mitótico y no durante el meiótico y viceversa. De un total de 18 regiones analizadas por electroforesis bidimensional en mitosis y meiosis, encontramos 3 que se activaban diferencialmente. *Ars1* es una región del cromosoma I que funciona como origen de replicación en mitosis pero no en meiosis y el origen de replicación asociado a la isla AT 1134 se activa exclusivamente en meiosis. La actividad del origen AT 1022 está en el límite de detección en mitosis pero es claramente visible en meiosis (FIGURA 24).

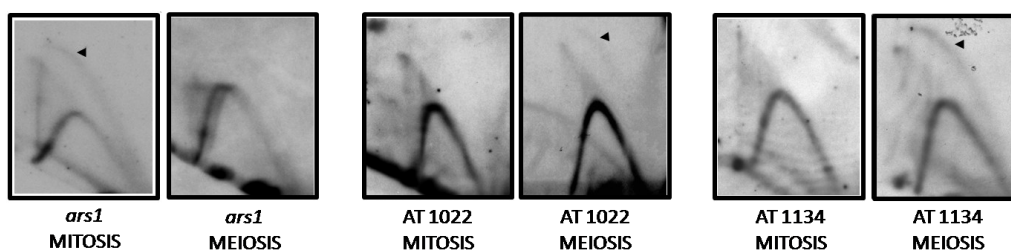


Fig.24 Activación diferencial de 3 ORIs en mitosis y meiosis. Análisis por electroforesis bidimensional de los orígenes de replicación *ars1*, isla AT 1022 e isla AT 1134 en mitosis y meiosis. La flecha negra indica la señal correspondiente a las burbujas de replicación en los casos de ORIs activos.

El primer objetivo de esta parte del trabajo fue estudiar la relevancia del contexto genómico en la activación del ORI *ars1* durante la meiosis. El segundo fue estudiar la relación entre la actividad ORI de *ars1* y la presencia de DSBs, ya que como se concluyó en el primer apartado de los Resultados, existe una alta tasa de colocación entre ORIs y DSBs meióticos.

Para ello, decidimos trasladar el fragmento de 1.2 kb que contenía el origen de replicación *ars1* al que ligamos el gen marcador *ura4⁺* a la región intergénica adyacente al gen *rhp7⁺* en el cromosoma III (FIGURA 25), que en la cepa silvestre no contenía ningún origen de replicación ni tampoco generaba DSBs meióticos. La cepa se construyó siguiendo la misma estrategia que en apartados anteriores.

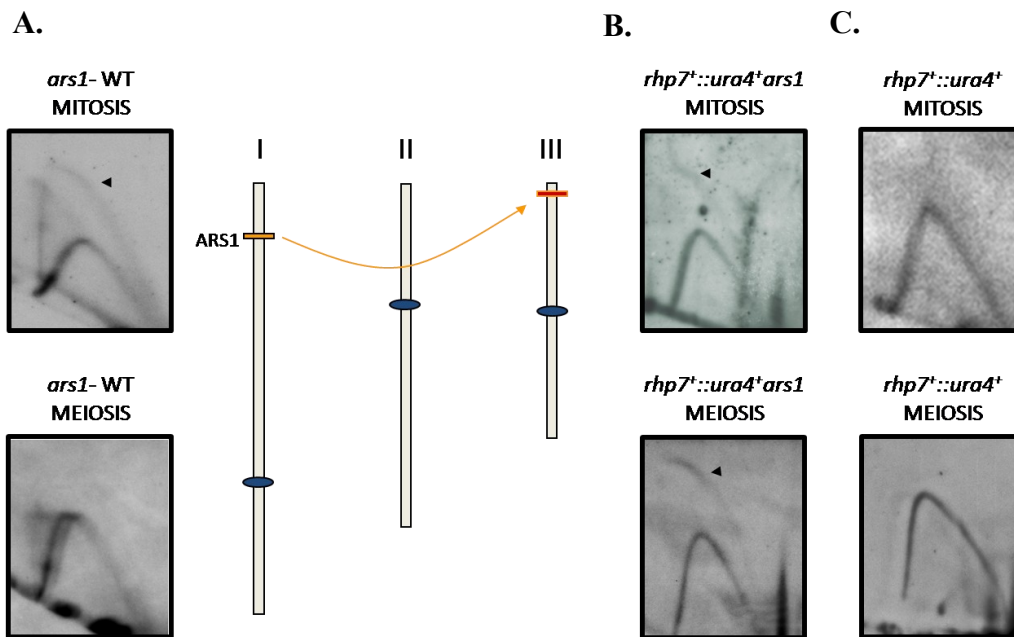


Fig.25 Activación diferencial del ORI *ars1* en mitosis y meiosis en dos localizaciones genómicas diferentes. A. El análisis mediante electroforesis bidimensional de *ars1* en su locus endógeno mostró que el ORI es activo en fase S mitótica pero no en fase S premeiótica. El arco activo se indica con una flecha negra. B. Translocación del fragmento de 1.2 kb que contenía *ars1* a una región del cromosoma III que se replicaba pasivamente en mitosis y meiosis en las células silvestres. Los geles bidimensionales muestran que *ars1* es activo en mitosis y meiosis en su localización ectópica (*rhp7⁺::ura4⁺ars1*). C. Análisis de la actividad ORI tras la integración del gen marcador *ura4⁺* sin *ars1* como control (*rhp7⁺::ura4⁺*).

El análisis mediante electroforesis bidimensional de la integración del ORI *arsI* en la región de *rhp7*⁺ reveló que en ese *locus arsI* era activo tanto en meiosis como en mitosis (*rhp7*⁺::*ura4*⁺*arsI*) (FIGURA 25B). Como control construimos una cepa en la que sólo integramos el gen marcador *ura4*⁺ en la misma región y comprobamos que en ella no había inicio de la replicación (*rhp7*⁺::*ura4*⁺) (FIGURA 25C). Este resultado indicaba que la secuencia de 1.2 kb de *arsI* tenía la capacidad de funcionar como origen de replicación meiótico y que el contexto genómico era un factor determinante para su activación.

Dado que en apartados anteriores de este trabajo habíamos podido comprobar que existía una alta tasa de colocación de orígenes de replicación y DSBs meióticos, quisimos comprobar si en el ORI *arsI* ectópico activo en meiosis podría haberse generado un nuevo sitio de DSBs. Para ello analizamos la presencia de DSBs en *arsI* en las dos localizaciones, endógena y ectópica, aunque el *locus* endógeno de *arsI* no había sido descrito como sitio de unión de la proteína Rec12 por inmunoprecipitación de cromatina (Cromie et al, 2007).

El análisis mediante *Southern blot* reveló que en la localización endógena de *arsI* (ORI inactivo en meiosis) no existían DSBs detectables. En cambio, la integración de *arsI* en la región intergénica adyacente a *rhp7*⁺ (ORI activo en meiosis) estaba asociada con la generación de un sitio nuevo de DSBs (FIGURA 26E). Como control se comprobó que tras la integración del gen marcador *ura4*⁺ sin ORI no se generaban DSBs. Para determinar si estos DSBs ectópicos eran, como en el caso de los endógenos, dependientes de la proteína Rec12, se deletionó el gen *rec12*⁺ en la cepa en la que se había integrado el ORI ectópico *arsI*. En esta cepa se sustituyó la ORF completa del gen *rec12*⁺ por el marcador *KanMX4*, que confiere a las células capacidad de resistencia al antibiótico geneticina (ver apartado 2.2 de Materiales y métodos). El análisis por *Southern blot* indicó que el sitio nuevo de DSBs asociado a *arsI* en posición ectópica era dependiente de Rec12, como los sitios de DSBs naturales (FIGURA 26E).

Los resultados obtenidos en este apartado indicaban que el contexto genómico determinaba que un origen de replicación se activara durante la fase S mitótica o premeiótica y también que se generaran DSBs meióticos dependientes de Rec12.

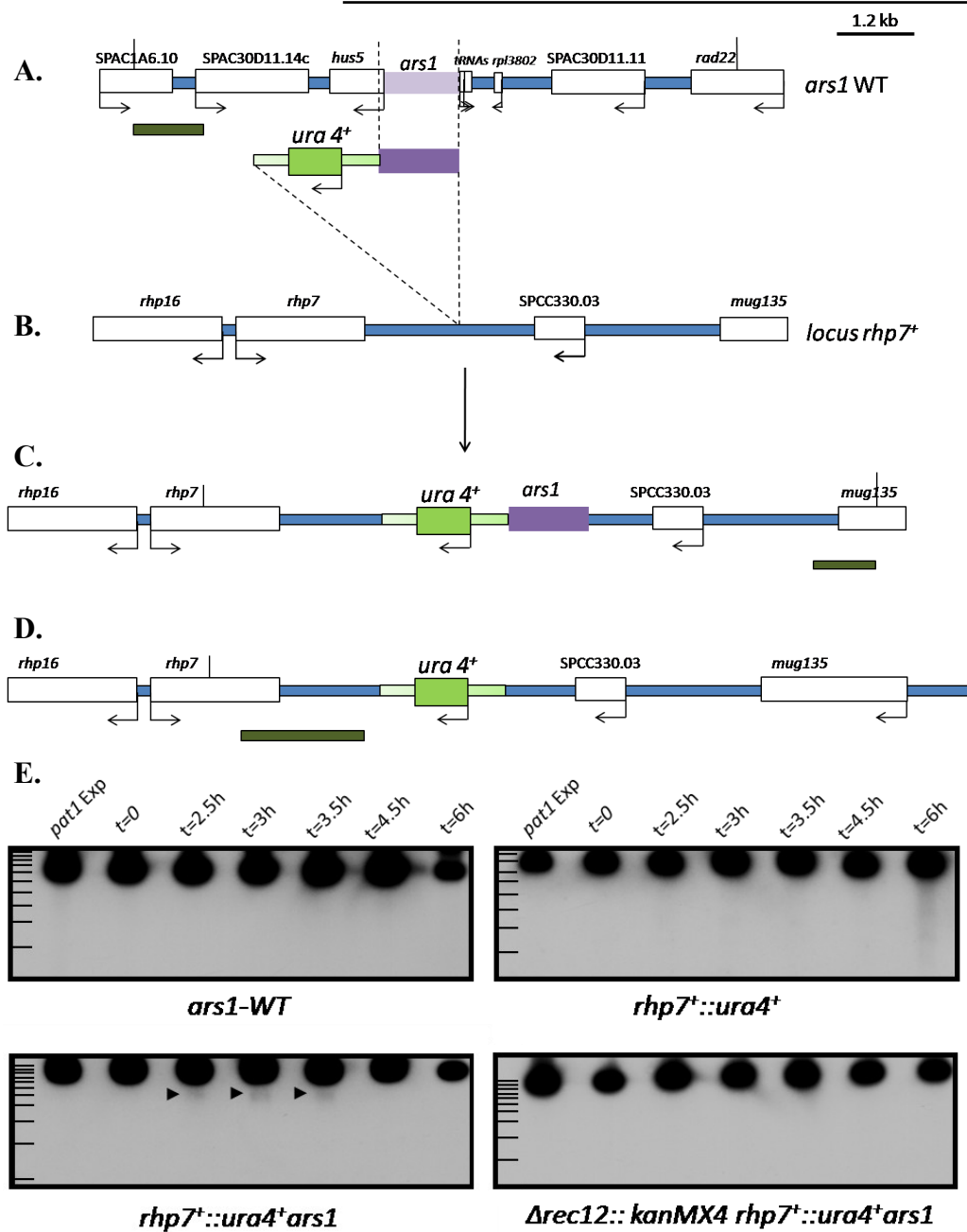


Fig.26 A. Mapa de la región *ars1* en la cepa silvestre. Los genes se indican con rectángulos blancos y las flechas muestran el inicio de las ORFs. Las líneas verticales continuas indican el fragmento de restricción analizado por *Southern blot* para el análisis de DSBs y la sonda utilizada se indica con un rectángulo verde oscuro. El fragmento delimitado por la línea de puntos corresponde al ORI *ars1* que se trasladó al cromosoma III en este experimento. B. Mapa de la región intergénica adyacente al gen *rhp7+* en la cepa silvestre. La línea de puntos indica la integración de *ars1* y el gen marcador *ura4+* en esta región. C. Mapa de la integración del ORI *ars1* y el gen marcador *ura4+* en la región intergénica adyacente al gen *rhp7+*. D. Mapa de la integración del gen marcador *ura4+* sin ORI en la región intergénica adyacente al gen *rhp7+*. E. *Southern blots* de geles de plugs de agarosa. *Ars1* en su sitio endógeno (*ars1*-WT), en la región intergénica adyacente a *rhp7+* (*rhp7+::ura4+ars1*), control del marcador *ura4+* solo integrado en *rhp7+* (*rhp7+::ura4+*) y por último *ars1* en el sitio *rhp7+* en la cepa *Δrec12* (*Δrec12::kanMX4 rhp7+::ura4+ars1*). Se observa que sólo en el caso del *ars1* ectópico (único caso de ORI activo) aparecen DSBs dependientes de Rec12 (señalados con flechas en el *blot*) en las muestras de 2 h 30 min, 3 h y 3 h 30 min, que son los tiempos correspondientes a la recombinación meiótica.

3.2 UNA LONGITUD DE 3 kb DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ES REQUISITO SUFICIENTE PARA LA GENERACIÓN DE UN SITIO DE DSBs

Uno de los resultados obtenidos en el apartado anterior mostraba que la integración del fragmento de 1.2 kb que contenía el ORI *arsI* en una región ectópica generaba un nuevo sitio de DSBs. Este resultado discrepaba con las observaciones llevadas a cabo en el apartado 2.1 de Resultados, que permitieron demostrar que la activación de un ORI y la generación de DSBs eran procesos independientes, aunque ambos se encontraran en la misma región intergénica. La integración del fragmento que contenía el ORI *arsI* en la región intergénica adyacente al gen *rhp7⁺* suponía dos cambios importantes: uno, la incorporación de un ORI a una región intergénica que antes carecía de él y otro, el alargamiento de la región libre de transcripción. En este apartado quisimos disociar ambas características para saber si las dos o sólo una de ellas había sido responsable de la aparición de los DSBs. Para ello decidimos integrar en la región intergénica adyacente al gen *rhp7⁺* un ORI en un fragmento más pequeño que el de *arsI* (1.2 kb) de manera que extendiese menos la región intergénica. En otra cepa integraríamos una región libre de transcripción que no funcionara como origen de replicación pero supusiera un alargamiento de la región libre de transcripción equivalente al que suponía la integración de *arsI*.

Parte I. INTEGRACIÓN DE UN ORI DE 400 pb EN LA REGIÓN DE *rhp7⁺*

En estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio para la caracterización de los orígenes de replicación de *S. pombe* se diseñaron secuencias sin homología con el genoma de *S. pombe* con un contenido en los nucleótidos adenina y timina del 83% capaces de iniciar la replicación en plásmidos y en el genoma. Elegimos el fragmento AT2 de 400 pb y lo integramos en la región intergénica adyacente al gen *rhp7⁺*. Para ello se integró el fragmento AT2 unido al fragmento de 1.7 kb que contenía el gen marcador *ura4⁺* flanqueado por los casetes de recombinación homóloga dirigidos a esa región del genoma. Las cepas haploides se construyeron como en los casos anteriores y los diploides se obtuvieron por fusión de protoplastos. El genotipo de la cepa diploide fue: *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺AT2 /rhp7⁺::ura4⁺AT2 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*. La electroforesis bidimensional mostró que AT2 funcionaba como ORI mitótico y meiótico. Sin embargo el *Southern blot* de DNA en *plugs* de agarosa reveló que no se generaban DSBs detectables en esta región (FIGURA 27). Estos resultados indicaban que la activación del ORI *per se* no era requisito suficiente para la generación de DSBs en esta región. Esto concordaba con los resultados obtenidos en el apartado 2.1, con los que se demostró que el ORI AT1034 y los DSBs en ese *locus* eran independientes.

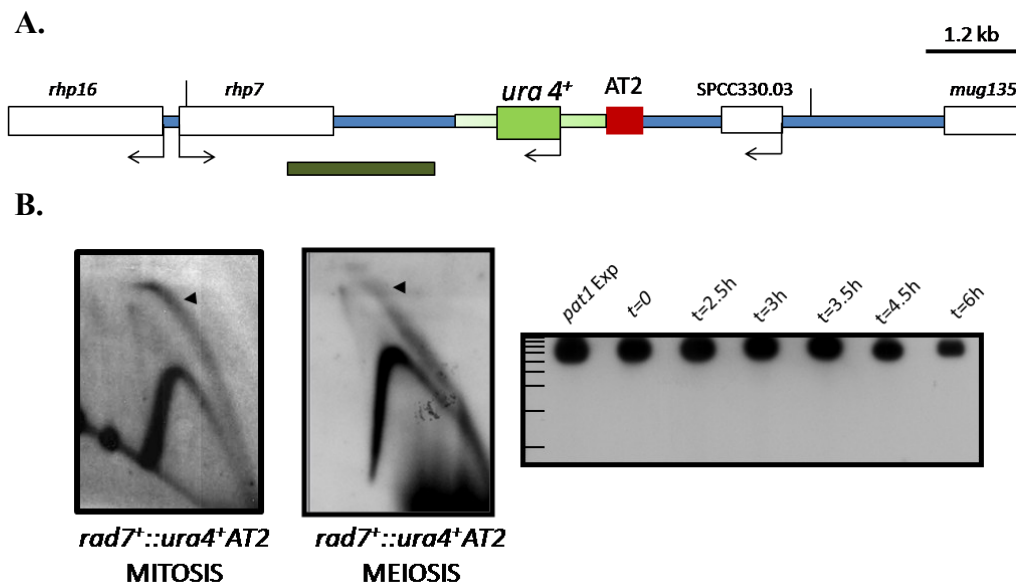


Fig.27 A. Mapa de la región intergénica adyacente al gen *rhp7*⁺ tras la integración del fragmento AT2 acompañado del gen marcador *ura4*⁺. El mapa muestra con líneas verticales el fragmento de restricción analizado y con un rectángulo verde la sonda utilizada para el análisis de los DSBs. B. Análisis por electroforesis bidimensional y *Southern blot* de la región intergénica adyacente al gen *rhp7*⁺ tras la integración del fragmento AT2. En los geles bidimensionales de mitosis y meiosis las flechas señalan en cada caso el arco de burbuja. A la derecha, en el análisis por *Southern blot* de DNA en *plugs* de agarosa no se detectó la presencia de DSBs en esa región.

Parte II. EXTENSIÓN DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ADYACENTE AL GEN *rhp7*⁺

La integración del ORI *ars1* (inactivo en meiosis) en la región intergénica adyacente al gen *rhp7*⁺ generaba un nuevo sitio de DSBs y la activación del origen en meiosis. La generación de este nuevo sitio de DSBs podía deberse a la incorporación de un ORI a una región intergénica que antes carecía de él o al alargamiento de la región libre de transcripción. La integración de un ORI de menor longitud que *ars1* (1.2 kb), AT2 (400 pb), nos permitió comprobar que no era la actividad ORI *per se* lo que determinaba la formación de DSBs, ya que este fragmento generaba un ORI mitótico y meiótico pero no DSBs (FIGURA 27). Para comprobar si había sido la extensión de la región libre de transcripción el factor determinante para la generación de DSBs al insertar el ORI *ars1* ectópico, se eligieron dos regiones del genoma que en su *locus* natural no se transcribían, no tenían actividad ORI ni en ellas se detectaban señales de unión de la proteína Rec12 por inmunoprecipitación de cromatina (Cromie et al, 2007). Se trataba de las regiones C5 y R3 (de 1.9 y 1.5 kb respectivamente), que habíamos utilizado en los experimentos descritos en el apartado 2.3 de Resultados (FIGURA 19). Para comprobar si ambos fragmentos eran capaces de generar DSBs en la región de *rhp7*⁺, se integraron de forma independiente en la misma

posición en la que se realizó la integración de los fragmentos *arsI* y AT2 descritos anteriormente. Las regiones C5 y R3 también se integraron acompañadas por el gen marcador *ura4⁺* (FIGURA 28A).

En ambas cepas comprobamos que las regiones integradas no funcionaban como ORIs meióticos en su localización ectópica (FIGURA 28B). Sin embargo en ambos casos se generaron DSBs prominentes en esta nueva localización genómica durante los tiempos correspondientes a la recombinación meiótica (FIGURA 28B). Estos resultados indicaban que la generación de DSBs estaba determinada por la longitud de la región libre de transcripción y era independiente de la presencia de un origen de replicación.

En la FIGURA 29 se muestra un resumen de las integraciones llevadas a cabo en la región de *rhp7⁺*.

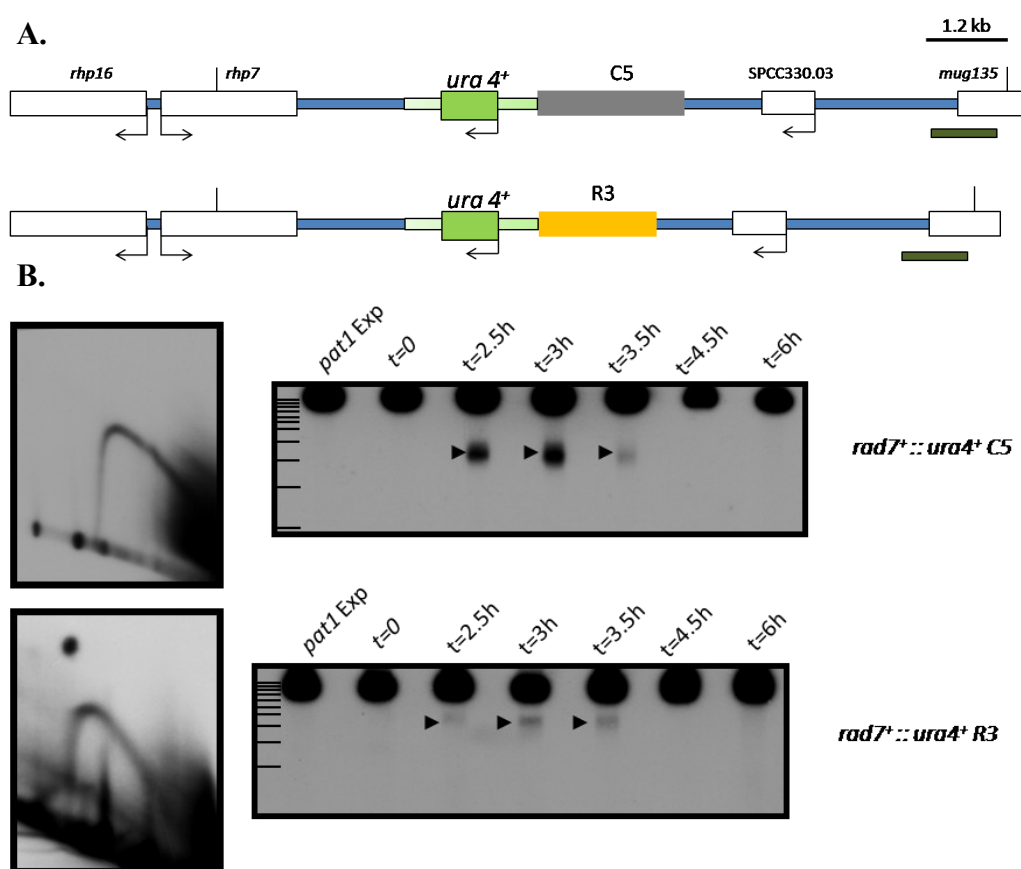


Fig.28 A. Mapas de la región intergénica adyacente al gen *rhp7⁺* tras la integración de los fragmentos C5 y R3. Los mapas muestran con líneas verticales los fragmentos de restricción y con un rectángulo verde oscuro la sonda utilizada para el análisis de los DSBs. B. Análisis por electroforesis bidimensional y Southern blot. En los geles bidimensionales de meiosis no se detectan arcos de burbuja. A la derecha, en los análisis por Southern blot de DNA en *plugs* de agarosa se detectó la presencia de DSBs en ambas regiones.

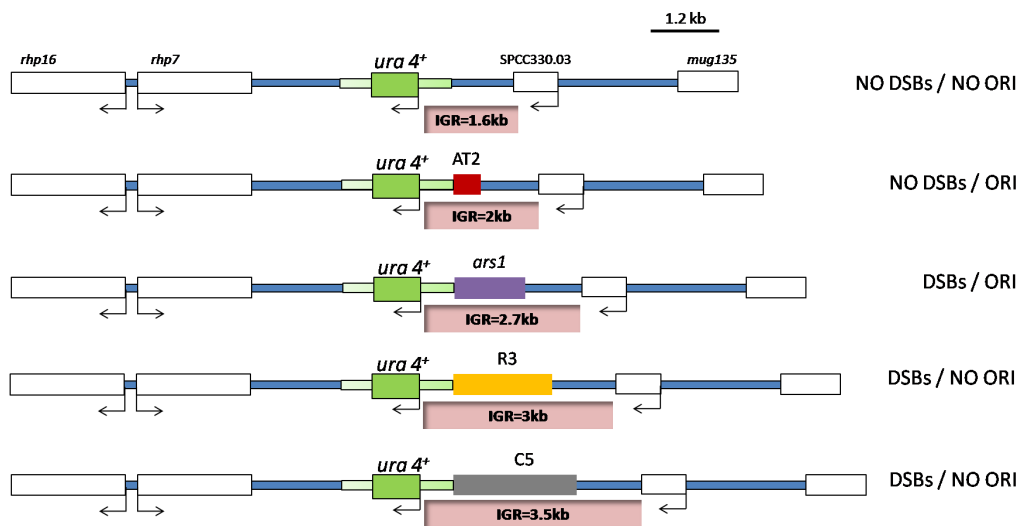


Fig.29 **Resumen de las integraciones llevadas a cabo en la región de *rhp7+***. Mapas de la región de *rhp7+* en las cepas construidas para el trabajo descrito en este apartado. Los genes están representados por rectángulos blancos y la flecha negra representa el inicio de la ORF. En cada uno de los casos se señala la longitud alcanzada de la región intergénica y la presencia o ausencia de DSBs y ORI.

La extensión de la región intergénica adyacente al gen *rhp7+* tras las integraciones de cinco regiones ectópicas permitía la generación de DSBs meióticos dependiendo del tamaño de la región libre de transcripción y no de la actividad ORI.

DISCUSIÓN



1. COLOCALIZACIÓN DE ORÍGENES REPLICACIÓN ACTIVOS Y *HOTSPOTS* DE RECOMBINACIÓN DURANTE LA MEIOSIS EN *S. pombe*

El *hotspot* de recombinación mejor estudiado en *S. pombe* ha sido la mutación *ade6-M26*. Una mutación simple G→T que da lugar a un codón sin sentido en el extremo 5' del gen *ade6*. Esta mutación crea un heptámero esencial para la actividad *hotspot*: 5'-ATGACGT-3' (Schuchert et al, 1991). Esta secuencia es parte del sitio de unión del factor de transcripción Atf1-Pcr1, el cual también es necesario para la actividad del *hotspot* (Kon et al, 1997). En un trabajo llevado a cabo por Steiner & Smith (2005b) se utilizó una secuencia más extendida de la cual forma parte el heptámero M26, 5'-GNVTATGACGTCATNBNC-3' (V es A, C o G; B es C, G o T; N es cualquier nucleótido). Se analizaron 15 sitios del genoma que contenían esa secuencia consenso por *Southern blot* y 13 eran sitios de DSBs meióticos (Steiner & Smith, 2005a). Pero en este mismo trabajo se comprobó que esa secuencia consenso no era suficiente, ya que había regiones del genoma que la contenían donde no se formaban DSBs. Además, la presencia de Atf1-Pcr1 no era necesaria para la formación de DSBs en algunos de los 13 sitios encontrados. El factor de transcripción Atf1-Pcr1 y la secuencia consenso que constituye su sitio de unión al DNA, eran el único factor determinante conocido de los *hotspots* meióticos en *S. pombe*. En el trabajo de Cromie et al (2007) se comprobó que no existía una relación significativa entre los promotores de genes inducidos en meiosis (Mata et al, 2002) y los sitios de unión de Rec12.

En un estudio posterior llevado a cabo por Steiner et al. (2009) se analizó si existía una secuencia nucleotídica que permitiera distinguir los *hotspots* de DSBs meióticos de otras regiones del genoma. Se encontró que en el *locus* del gen *ade6⁺* se podía generar un *hotspot* de recombinación integrando algunos fragmentos de 15 a 30 pb procedentes de una librería de secuencias de DNA, pero no otros. El 0.6% de los fragmentos de 15 pb integrados al azar generaban un *hotspot* observable y el 20% de los *hotspots* generados contenían en su secuencia el motivo CRE: TGACGT, que se sabía que era requerido para los todos los *hotspots* dependientes de Atf1-Pcr1 en *S. pombe*. Esto sugería que al menos en ese *locus* existía algún requerimiento de secuencia para la formación del *hotspot*.

Se ha encontrado una correlación inversa entre la localización de DSBs y la de la cohesina meiótica Rec8. Estudios llevados a cabo en *S. cerevisiae* llegaron a la conclusión de que los DSBs ocurrían en *loops* donde la densidad de Rec8 era baja (Glynn et al, 2004). En *S. pombe* se ha observado una correlación negativa, aunque no tan fuerte como en *S. cerevisiae*, entre los sitios de unión de Rec8 y Rec12 (Cromie et al, 2007). En un estudio llevado a cabo por Wahls & Davidson (2008) se comparó la distribución genómica de DSBs con 68 RNAs poliadenilados no codificantes procedentes de una genoteca y se comprobó que el 35.3% estaban asociados con sitios de DSBs (respecto al 10.5% esperado si la colocalización se debiera al azar).

En nuestro trabajo quisimos comprobar si existía una colocación de los DSBs con ORIs ya que ambos fenómenos suceden en regiones intergénicas largas y previamente se había descrito que en mitosis la activación de los orígenes de replicación en *S. pombe* estaba asociada a una alta tasa de recombinación homóloga (Segurado et al, 2002). Por estos motivos en primer lugar realizamos un análisis bioinformático comparando los mapas genómicos de DSBs y ORIs.

Para nuestro estudio de colocación de ORIs y DSBs utilizamos como referencia el mapa genómico de DSBs meióticos realizado por Cromie et al (2007). El mapa se realizó mediante inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos anti-FLAG en una cepa *Rec12-FLAG rad50S* en la que las roturas meióticas se acumulan, ya que son generadas por la endonucleasa Rec12 pero no son reparadas. Mediante hibridación de *microarrays* con el DNA inmunoprecipitado se comprobó que la distribución de DNA unido covalentemente a Rec12 era prácticamente idéntica a la distribución de DSBs observados por *Southern blot* y que la intensidad de unión de la proteína al DNA era comparable a la intensidad de la señal en el *Southern blot* en cada región analizada. También se concluyó que la característica más fuertemente asociada a los DSBs era que se producían en regiones intergénicas excepcionalmente largas. Aproximadamente el 50% de las IGRs mayores de 3 kb tienen sitios de unión de Rec12 y estas IGRs cuentan en total con el 50% de los sitios de unión de Rec12 detectados en el *array* (Cromie et al, 2007).

Ludin et al (2008) llevaron a cabo otro análisis genómico de la localización de Rec12 en una cepa *S. pombe Rec12-myc rad50S*. En él también se observó que la proteína se unía mayoritariamente a regiones intergénicas. Sin embargo decidimos no utilizar este trabajo como base de datos para nuestro estudio por dos razones principales: una es que la inmunoprecipitación de la cromatina se realizó después de llevar a cabo un *cross-linking* con formaldehído para fijar covalentemente las proteínas al DNA. Esto hizo que aparecieran sitios de unión de la proteína Rec12 al DNA que no representaban una unión covalente real. De esta manera en este análisis la proteína Rec12 aparecía distribuida más uniformemente a lo largo del genoma, quizá debido a que sólo una fracción de Rec12 estaba unida covalentemente al DNA de manera natural y por tanto generando activamente las roturas. El segundo motivo fue que las hibridaciones se llevaron a cabo en 2 *microarrays*, uno de ORFs y otro de IGRs, al igual que en el trabajo de Heichinger et al (2006) para los orígenes de replicación. La gran distancia entre las sondas utilizadas en ambos *arrays* (hasta 2 kb) hizo que sólo se detectaran 114 sitios de unión de Rec12 frente a los 304 sitios con señales de Rec12 localizados en el trabajo de Cromie et al (2007).

La publicación de los artículos de Cromie et al (2007) y Ludin et al (2008) supuso un avance importante en el conocimiento de la distribución de los sitios de unión de Rec12 en el genoma, pero seguían sin conocerse los factores que determinaban que fueran esas regiones y no otras las elegidas por la proteína para la generación de DSBs.

Como mapas genómicos de orígenes de replicación se utilizaron los descritos en [Segurado et al \(2003\)](#) y [Hayashi et al \(2007\)](#) (ver apartado 1.2 Introducción) aunque en ambos casos eran predicciones de orígenes mitóticos. El único mapa de orígenes meióticos publicado hasta la fecha ha sido realizado por [Heichinger et al \(2006\)](#). Sin embargo este mapa no se utilizó como base de datos debido a que la gran distancia entre las sondas utilizadas en el *array* podría causar un sesgo positivo en la colocación con los DSBs.

Utilizamos como referencia 469 ORIs mitóticos, que incluían las islas AT de [Segurado et al \(2003\)](#) y los ORIs predichos por [Hayashi et al \(2007\)](#). Del total de 469, 171 se encontraban a menos de 2 kb de un sitio de unión de la proteína Rec12. Según esta estimación, el 36.5% de los ORIs colocalizaban con un sitio de DSBs. De las 304 regiones de unión de Rec12 encontradas en el *array* de [Cromie et al \(2007\)](#), el 56.2% se situaban a menos de 2 kb de un ORI. Teniendo en cuenta que en el genoma de *S. pombe* existen 5000 regiones intergénicas, los 469 ORIs descritos ocupaban el 9.4% de ellas. De manera que el 56.2% de coincidencia con DSBs suponía un incremento de unas 6 veces respecto a la colocación que pudiera deberse al azar.

Esta colocación podría deberse simplemente a motivos físicos, ya que ambos fenómenos se estarían produciendo en regiones intergénicas grandes que serían más accesibles a la maquinaria de replicación y recombinación. Los resultados obtenidos en el apartado 2 de Resultados concordaban con esta hipótesis ya que permitieron comprobar que no existía una dependencia funcional entre la formación de ORIs y DSBs.

A continuación analizamos por electroforesis bidimensional la posible presencia de orígenes de replicación activos durante la fase S premeiótica en 13 regiones intergénicas del genoma en las que se había comprobado la presencia de DSBs ([Steiner & Smith, 2005a](#)). Solamente 6 de estas 13 regiones colocalizaban con ORIs descritos previamente por [Hayashi et al \(2007\)](#) o [Segurado et al \(2003\)](#), de manera que esta muestra de DSBs nos permitió comprobar experimentalmente si había una colocación mayor de la predicha por el análisis informático. La detección de orígenes de replicación meióticos en 8 de las 13 regiones analizadas (**FIGURA 11**) indicaba que al menos en el tiempo de la meiosis sincrónica en el que habían sido extraídas las muestras de DNA, el 61% de las regiones analizadas colocalizaban con ORIs meióticos. Se detectaron 2 ORIs meióticos asociados con los sitios de DSBs 1-3 y 3-5 no descritos previamente como ORIs mitóticos ni por su contenido en A+T ni por la unión de ORC. Además en el caso del sitio 1-4 se comprobó que el ORI es activo durante la fase S premeiótica pero no durante el ciclo mitótico (**FIGURA 12**).

También quisimos comprobar experimentalmente si el porcentaje de ORIs que colocalizaba con DSBs era próximo a la predicción hecha a nivel genómico. Para ello se analizó la presencia de DSBs en 8 ORIs meióticos. En este análisis, para comprobar de forma rigurosa si los ORIs activos colocalizaban con DSBs, incluimos 4 (1033, 1131, 1152 y 2112) que no habían sido identificados como sitios de unión de Rec12 por Cromie et al (2007). De los restantes, sólo uno, la isla AT 3056 se encontraba en la misma región intergénica que un sitio de unión de Rec12. En el caso de 2014, 2091 y 3040 se detectaban señales de Rec12 a menos de 2 kb del ORI. Todos ellos se encontraban en regiones intergénicas de tamaños entre 1.2 y 1.9 kb (TABLA 1). El análisis por *Southern blot* de estas regiones nos permitió detectar DSBs que colocalizaban con las islas AT 2014, 2091, 2112, 3040 y 3056 (FIGURA 14). En las tres regiones restantes, las islas AT 1033, 1131 y 1152 no se detectó la presencia de DSBs. Las roturas en el DNA detectadas en la isla AT 2112 eran más tenues que las detectadas en otros casos, como en la isla AT 2014 o 3056. Este dato concordaba con la no detección de Rec12 en el *array* en esa región, donde la unión de la proteína podría ser más débil y por lo tanto indetectable por inmunoprecipitación de cromatina. Para comprobar la dependencia de Rec12 de estas roturas, en las cinco regiones se confirmó experimentalmente que no se formaban en un mutante $\Delta rec12$ (FIGURA 14).

Isla AT	Tamaño IGR (kb)	DSBs
1033	1.5	-
1131	1.6	-
1152	1.2	-
2014	1.6	+
2091	1.9	+
2112	1.4	+
3040	1.9	+
3056	1.5	+

Tabla1. **Tabla con los tamaños de las regiones intergénicas (IGRs) de las islas AT analizadas.** En la tabla se hace referencia a la distancia entre las ORFs adyacentes a las islas AT indicadas.

La existencia de sitios de DSBs débiles podría explicar la discrepancia encontrada entre sitios de *crossing-over* y sitios de unión de Rec12 en *S. pombe* (Young et al, 2002). Estos sitios serían utilizados por la célula como sitios de DSBs con menor frecuencia, aunque un porcentaje elevado de ellos, por motivos aún desconocidos, podrían resolverse como *crossing-over*. Estos sitios de roturas menos frecuentes serían, al igual que los más prominentes, dependientes de Rec12 y capaces de generar recombinación homóloga.

Los resultados obtenidos experimentalmente respecto a la colocalización de ORIs y DSBs, no sólo confirmaban el porcentaje descrito en el análisis bioinformático a nivel genómico sino que además demostraban que éste era una estimación mínima ya que en sitios de DSBs se encontraron experimentalmente regiones que contenían ORIs no predichos anteriormente y viceversa, en regiones de ORIs se encontraron DSBs no predichos mediante la unión de Rec12.

2. ESTUDIO DE LA DEPENDENCIA FUNCIONAL ENTRE LA ACTIVIDAD DEL ORIGEN DE REPLICACIÓN AT 1034 Y LA GENERACIÓN DE DSBs EN *mbs1*

Los resultados de la colocalización de ORIs y DSBs meióticos sugerían una posible dependencia funcional entre la activación de los orígenes de replicación y la correcta formación de los DSBs durante la meiosis en *S. pombe*. En *S. cerevisiae* se había observado en una región del cromosoma III que cuando ésta se replicaba de forma tardía durante la fase S premeiótica, se detectaba un retraso en la formación de los DSBs en esa región (Borde et al, 2000).

Para estudiar la posible dependencia funcional entre ORIs y DSBs seleccionamos dos regiones del genoma de *S. pombe*. Una de ellas fue la región intergénica que contenía el *hotspot* de recombinación *mbs1* (Young et al, 2002) y la isla AT 1034 en el cromosoma I, donde ambos procesos colocalizaban de forma natural. La otra región elegida fue la región intergénica adyacente al *locus* del gen *rhp7⁺* en el cromosoma III, donde no existía ningún ORI ni se generaban DSBs endógenos, de manera que pudimos inducir ambos procesos artificialmente integrando diversas secuencias, lo cual nos permitió discernir cuáles eran los requerimientos necesarios para la formación de ORIs y DSBs.

Los DSBs en el sitio *mbs1* se extienden a lo largo de 2.1 kb en la región intergénica del cromosoma I que se sitúa entre los genes SPAC4G8.03 y SPAC4G8.04 (Young et al, 2002). Además, se ha comprobado que *mbs1* es un *hotspot* de conversión génica y de *crossing-over* (Cromie et al, 2005).

Nuestro análisis se basó en la observación de que el origen de replicación asociado a la isla AT 1034 se encontraba en la misma región intergénica que *mbs1* (FIGURA 15A). Por este motivo decidimos estudiar si existía alguna influencia de la actividad del origen de replicación AT 1034 sobre la formación de las roturas meióticas en esta región y viceversa, es decir, si la correcta formación de las roturas generadas por la endonucleasa Rec12 determinaba una eficiente activación del origen de replicación en este *locus*.

2.1 DELECIÓN DE LA ISLA AT 1034

Para estudiar si la formación de DSBs en *mbs1* dependía de la correcta activación del ORI AT 1034 construimos una cepa en la que se reemplazaron 980 pb que incluían la isla AT 1034 por el gen marcador *ura4*⁺ manteniendo intacta la región adyacente de 2.1 kb que contenía los DSBs. El resultado mostró que la delección de la región más rica en A+T suponía una disminución de la actividad ORI pero no una abolición de la misma. Además se comprobó que esta disminución de la actividad del origen de replicación no afectaba a la formación de DSBs en la secuencia adyacente, *mbs1*, que se encontraba en la misma región intergénica que el ORI (FIGURA 17).

La permanencia de la actividad ORI en la región de la isla AT delecionada concordaba con resultados obtenidos por otros grupos y también en nuestro laboratorio. En un estudio llevado a cabo por Kong & DePamphilis (2002) en *S. pombe* se comprobó que Orc4 se une tanto *in situ* como *in vitro* a dos fragmentos diferentes dentro del ORI ars 3001. En otro estudio llevado a cabo por Takahashi et al (2003) se delecionaron en el genoma tres fragmentos dentro del ORI ars 2004 de manera individual y combinada. Por electroforesis bidimensional se comprobó que en las cepas con las delecciones individuales, la eficiencia del ORI ars 2004 no se veía afectada. En cambio en las cepas con las delecciones combinadas el ORI reducía notablemente su eficiencia o perdía totalmente su actividad. En nuestro laboratorio se llevaron a cabo delecciones de distintos elementos dentro de la isla AT 1090 y también se observó que el ORI permanecía activo incluso en ausencia de tres elementos que de forma independiente eran ORIs activos en ensayo ARS (Cotobal et al, 2009; enviado para publicación). Los tres estudios sugieren que varias moléculas de ORC se unen a la región intergénica que contiene el origen de replicación o que varios elementos dentro del ORI son capaces de unir la proteína. De acuerdo con estas observaciones previas, nuestros resultados indican que tras la delección de la isla AT 1034 se produce una disminución pero no una pérdida total de la actividad ORI, probablemente debido a la permanencia de algún sitio de unión de la proteína Orc4 a esa región.

El resultado del experimento mostró que la pérdida de eficiencia del ORI no afectaba a la formación de DSBs, lo cual nos permitió concluir que no existía una dependencia funcional entre la actividad del ORI y la formación de los DSBs. Este dato estaba de acuerdo con el 40% de los sitios de unión de Rec12 del genoma que no colocalizaban con ORIs, lo cual sugería que la formación de DSBs podría ser totalmente independiente de la actividad de los orígenes de replicación.

2.2 DELECIÓN DE LA REGIÓN DE 2.4 kb QUE CONTENÍA EL *HOTSPOT* DE RECOMBINACIÓN *mbs1*

En este apartado de nuestro trabajo se delecionó la región de 2.4 kb en la que se producían los DSBs en el *hotspot* de recombinación *mbs1*. El primer objetivo de esta parte del estudio era saber si eran necesarias las secuencias sobre las que se producen los DSBs o si éstos podrían generarse sobre otras secuencias que las reemplazasen en el mismo lugar. El segundo objetivo era estudiar si la posible supresión de los DSBs afectaría a la activación del origen de replicación.

El resultado mostró que la integración del gen marcador *ura4⁺* suponía la abolición de los DSBs de *mbs1* (FIGURA 18). Pero además del cambio de secuencia se había introducido otra variable, el gen *ura4⁺* se transcribía activamente, ya que los cultivos crecen en medio mínimo suplementado con leucina durante la meiosis sincrónica, así que la transcripción del gen marcador *ura4⁺* era esencial para la supervivencia de la célula. Los experimentos llevados a cabo en el apartado 2.4 de Resultados nos permitieron comprobar posteriormente que el reemplazamiento del gen *ura4⁺* por una región no transcrita diferente de la endógena permitía la formación de DSBs. Por lo tanto la abolición de los DSBs tras la integración del gen *ura4⁺* podría haber sido debida únicamente a la transcripción de éste. Este resultado concuerda con las observaciones de que los sitios de unión de Rec12 en el genoma se sitúan en regiones intergénicas grandes libres de transcripción.

Cuando se analizó la actividad del ORI adyacente AT 1034 en la cepa con los sitios de DSBs de *mbs1* delecionados se vió que permanecía inalterada (FIGURA 18). Así que la correcta formación de las roturas no era esencial para la actividad del ORI adyacente. A pesar de que no conseguimos abolir totalmente la actividad del ORI, los resultados indicaban que la pérdida de eficiencia del ORI no afectaba a la formación de las roturas y que la ausencia de los DSBs más prominentes no alteraba la eficiencia de la actividad del origen de replicación.

2.3 INTEGRACIÓN DE DOS REGIONES INTERGÉNICAS ECTÓPICAS EN EL SITIO *mbs1*

La delección de la secuencia de 2.4 kb que contenía los DSBs de *mbs1* integrando en su lugar el gen marcador *ura4⁺* supuso la desaparición de los DSBs en ese *locus*. Una posible explicación era que existiese una secuencia en la región delecionada necesaria para la unión de la proteína Rec12. Otra explicación podría ser que la transcripción del gen marcador *ura4⁺* estuviera impidiendo la unión de Rec12 a esa región, aunque no necesitara una secuencia específica para hacerlo. Para distinguir entre ambas posibilidades, reemplazamos la región de 2.4 kb que contenía *mbs1* por las regiones C5 y R3, de 1.9 y 1.5 kb respectivamente en dos cepas diferentes, de manera que el ensayo se hizo por duplicado. Las secuencias C5 y R3 no contienen ORIs ni generan DSBs en su sitio endógeno en el genoma (FIGURA 19). El *Southern blot* mostró que las roturas volvían a aparecer durante la recombinación meiótica en el sitio *mbs1* delecionado después de la integración tanto del fragmento C5 como R3 (FIGURA 20). Este resultado indicaba que no había ningún patrón de secuencia reconocible por la maquinaria de recombinación en la región delecionada de *mbs1*, ya que sustituyéndolo por dos fragmentos del genoma, elegidos al azar, los DSBs se seguían generando en esa localización, pero ahora sobre las secuencias ectópicas C5 y R3. Otra explicación sería que las secuencias C5 y R3 no generaban DSBs en su *locus* endógeno en el genoma porque, aunque tuvieran el requerimiento de secuencia necesario, no estarían en el contexto adecuado. La integración en una región ectópica podría proporcionar a esos fragmentos una región intergénica libre de transcripción suficientemente larga para la generación de un *hotspot* de DSBs.

2.4 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ORI EN UN MUTANTE $\Delta rec12$

Una de las proteínas esenciales para la recombinación meiótica en *S. pombe* es la proteína Rec12, la endonucleasa que genera las roturas en el DNA. Rec12 es ortólogo a la subunidad A de la Topoisomerasa VI de *Archaea*. Estas topoisomerasas forman intermediarios fosfodiéster DNA-tirosina. En el caso de Spo11, el ortólogo a Rec12 en *S. cerevisiae*, se comprobó que la proteína se unía covalentemente al extremo 5' del DSB (Keeney et al, 1997) y que el residuo Tyr-135 era esencial para su acción (Bergerat et al, 1997). El residuo correspondiente en Rec12 de *S. pombe* es la tirosina Tyr-98 y los mutantes en esta tirosina son deficientes en la formación de DSBs y la frecuencia de recombinación del *hotspot ade6M26* se elimina casi totalmente (Cervantes et al, 2000).

En un trabajo llevado a cabo por [Davis & Smith \(2003\)](#) se observó que la segregación de los cromosomas homólogos durante la Meiosis I en el mutante $\Delta rec12$ era correcta en un 63% de los casos. Lo cual indica que existen mecanismos independientes de la recombinación que son capaces de promover la correcta segregación de los cromosomas homólogos. En un mutante $\Delta rec12$ se comprobó que en ausencia de la DNA flap endonucleasa Rad2, que procesa los cebadores de RNA de los fragmentos de Okazaki, la segregación correcta de los cromosomas se restaura casi hasta los niveles de la cepa silvestre ([Farah et al, 2005](#)). De esta manera la célula es capaz de iniciar la recombinación meiótica por mecanismos alternativos a la acción de Rec12, como los iniciados por *nicks* o *gaps* acumulados durante la fase S premeiótica por la falta de procesamiento de los fragmentos de Okazaki.

En esta parte del trabajo llevamos a cabo el análisis de la actividad ORI en un mutante $\Delta rec12$, aunque en el estudio del fenotipo de este mutante, [Lin & Smith \(1994\)](#) comprobaron mediante incorporación de uracilo marcado con H^3 que la fase S premeiótica progresaba igualmente en las cepas $\Delta rec12$, $\Delta rec6$ y WT. Pero los transcritos de $rec12^+$ aparecían a las 2 y 3 h del comienzo de la meiosis sincrónica en una cepa *pat1-114*, cuando la replicación del DNA todavía se está produciendo ([Lin & Smith, 1994](#)). Por este motivo quisimos comprobar si en una región intergénica donde ambos fenómenos coexistían, como *mbs1* y la isla AT 1034, la ausencia total de Rec12 afectaba a la correcta activación del origen de replicación. Los resultados obtenidos confirmaron que la activación del ORI era independiente de Rec12, ya que el análisis por electroforesis bidimensional de la región de la isla AT 1034 en ambas cepas, *pat1-114* y *pat1-114* $\Delta rec12$, mostró arcos activos de igual intensidad durante la fase S premeiótica (**FIGURA 23**).

3. ESTUDIO DE LOS REQUERIMIENTOS NECESARIOS PARA LA GENERACIÓN DE ROTURAS MEIÓTICAS

3.1 EL CONTEXTO GENÓMICO DETERMINA LA ACTIVACIÓN DE UN ORI Y LA FORMACIÓN DE DSBs DEPENDIENTES DE Rec12

El análisis de 18 regiones del genoma por electroforesis bidimensional en meiosis y mitosis había revelado que 3 de ellas se activaban diferencialmente. En dos casos se trataba de los orígenes de replicación asociados a las islas AT 1022 y 1134, que se activaban exclusivamente en meiosis. El otro caso era contrario, *ars1* era una región del cromosoma I que funcionaba como origen de replicación en mitosis pero no se activaba en meiosis (**FIGURA 24**).

En esta parte del trabajo se estudió la relevancia del contexto genómico en la activación del ORI *ars1* durante la meiosis y la posible relación entre la actividad ORI de *ars1* y la presencia de DSBs. Para esto integramos el fragmento correspondiente a la región intergénica de 1.2 kb que contiene el ORI *ars1* en la región intergénica adyacente al locus del gen *rhp7⁺* en el cromosoma III y analizamos por electroforesis bidimensional su actividad como ORI mitótico y meiótico en esta nueva localización ectópica. Así pudimos comprobar que el contexto genómico determinaba que el origen de replicación *ars1* se activara durante la fase S premeiótica (FIGURA 25). A continuación analizamos por *Southern blot* la presencia de DSBs y observamos que en esa región ectópica se generaban DSBs meióticos dependientes de Rec12 (FIGURA 26). La generación de DSBs podría deberse a la actividad del origen de replicación o al alargamiento de la región intergénica independientemente de la actividad del origen. Posteriormente comprobamos mediante la integración del ORI AT2, de menor tamaño que *ars1*, que la activación del ORI *per se* no es suficiente para la generación de un *hotspot* de DSBs.

La diferente activación del ORI *ars1* en mitosis y meiosis, junto con los casos de las islas AT 1022 y 1134 era un dato novedoso ya que no se ha publicado hasta el momento de la escritura de esta tesis que exista un patrón diferente de activación de orígenes de replicación mitóticos y meióticos en *S. pombe*. En el trabajo llevado a cabo por Heichinger et al (2006) se comprobó que la fase S premeiótica era más larga que la fase S mitótica porque los ORIs se activaban menos eficientemente, aunque la velocidad de las horquillas de replicación era semejante. Otra de las observaciones llevadas a cabo en ese trabajo fue que los ORIs se activaban más eficientemente en meiosis en determinadas regiones de los cromosomas, como por ejemplo a 600 kb de los telómeros de los cromosomas I y II o en una región concreta de 750 kb del cromosoma I. Los autores de ese trabajo especularon que podrían ser regiones de cromatina más condensada que se descondensaba en fase S premeiótica para facilitar la posterior recombinación meiótica y eso les serviría a los factores de inicio de la replicación para acceder mejor al DNA.

Este cambio en la configuración de la cromatina y por tanto en la accesibilidad de las proteínas al DNA en mitosis y meiosis concordaba también con el cambio en el patrón transcripcional en mitosis y meiosis, que requeriría que la accesibilidad de algunas regiones del genoma a la maquinaria de transcripción fuera diferente en ambos procesos. En el trabajo llevado a cabo por Mata et al (2002) se estudió el programa meiótico de *S. pombe* y se vio que 2000 genes se sobreexpresaban durante la meiosis más de 2 veces, 700 genes se sobreexpresaban más de 5 veces y cientos de genes se subexpresaban significativamente. Algunos de estos cambios se debían a la activación de factores de transcripción meióticos como Mei4 o Ste11, pero en otros grupos de genes se encontraba una correlación entre la posición física en el cromosoma y el perfil de expresión, de manera que podrían estar regulados por la arquitectura de la cromatina. Por ejemplo la activación transcripcional de regiones cercanas a los

telómeros, reprimidas por proteínas Ctr silenciadoras (modificadores de metilación y acetilación de histonas), se activaba en meiosis. Las regiones que sufrían cambios de expresión de los genes en meiosis respecto a mitosis no coincidían siempre con las de los ORIs que cambiaban su eficiencia durante este proceso. Pero el hecho de que una región que estaba silenciada en mitosis se comenzase a transcribir en determinadas fases de la meiosis podría producir cambios conformacionales de la cromatina que afectaran a la accesibilidad a la maquinaria de replicación de regiones ectópicas.

La disposición de los cromosomas durante la fase S premeiótica respecto a la fase S mitótica es diferente, ya que durante la fase S premeiótica los telómeros se unen al SPB y los cromosomas se alinean (Chikashige et al, 1997). Este cambio, junto con variaciones en más de la mitad del transcriptoma de la célula haría que la accesibilidad a las regiones libres de transcripción fuera totalmente diferente durante los procesos de fase S mitótica y meiótica. Y dado que tanto los ORIs como los DSBs son regiones sin secuencias consenso conocidas, su localización podría ser crucial para determinar su activación.

3.2 UNA LONGITUD DE 3 kb DE LA REGIÓN INTERGÉNICA ES REQUISITO SUFICIENTE PARA LA GENERACIÓN DE UN SITIO DE DSBs

La integración del fragmento de 1.2 kb que contenía el ORI *arsI* (inactivo en meiosis) en una región ectópica generaba un nuevo sitio de DSBs y la activación del origen en meiosis. La integración de un fragmento con actividad ORI más pequeño, AT2, de 400 pb y 83% A+T nos permitió comprobar que no era esa actividad *per se* lo que determinaba la formación de DSBs, ya que este fragmento generaba un ORI mitótico y meiótico pero no DSBs (FIGURA 27). En otras dos cepas integramos fragmentos de DNA sin actividad como origen de replicación pero que suponían una extensión de la región libre de transcripción equivalente o superior a la que suponía la integración de *arsI*. Este ensayo lo realizamos por duplicado con dos fragmentos distintos. Se trataba de los fragmentos C5 y R3 (de 1.9 y 1.5 kb respectivamente), que extendían la región libre de transcripción de 1.6 kb a 3.5 y 3 kb de longitud, respectivamente. El *Southern blot* mostró DSBs en ambos casos (FIGURA 28). Los experimentos demostraron que un fragmento de DNA libre de transcripción de aproximadamente 3 kb, independientemente de su capacidad de iniciar la replicación, era capaz de generar un nuevo sitio de DSBs.

1. El estudio de la distribución relativa de ORIs y DSBs a nivel genómico mostró que en un 56% de los sitios de unión de la proteína Rec12 existía un origen de replicación predicho. Asimismo, el 36% de las predicciones de ORIs coincidían con un sitio de DSBs. El análisis experimental sugiere que la colocalización real de ORIs y DSBs es aún mayor de la detectada *in silico* y llega a alcanzar el 60%.

2. Los experimentos llevados a cabo en dos regiones concretas del genoma indicaban que la activación de un origen de replicación no afectaba a la generación de DSBs en la misma región intergénica y que la abolición de los DSBs tampoco afectaba a la actividad del ORI. Esto nos permite afirmar que a pesar de la elevada colocación no existe una dependencia funcional entre la correcta activación de un ORI y la generación de DSBs.

3. Mediante el análisis por electroforesis bidimensional de 18 ORIs en los ciclos mitótico y meiótico se observó que existe una activación diferencial de aproximadamente un 16% de los ORIs en ambas fases S. Además, se comprobó que el contexto genómico es determinante en la activación de un ORI y en la generación de DSBs en meiosis.

4. El reemplazamiento de secuencias en dos regiones del genoma demostró que la generación de DSBs no depende de secuencias específicas de DNA sino que tiene lugar en regiones intergénicas no transcritas de al menos 3 kilobases, tanto en la configuración genómica natural como en regiones de esa longitud generadas artificialmente a partir de regiones de menor tamaño.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS Y MEDIOS DE CULTIVO

1.1 LEVADURAS

Las características genéticas de las cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo fueron:

- *h⁻ 972*
- *h⁻ ura4-D18*
- *h⁻/h⁻ pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻ pat1-114 ura4-D300 leu1-32 ade6M210*
- *h⁻ pat1-114 ura4-D300 leu1-32 ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺/rhp7⁺::ura4⁺ pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺ars1/rhp7⁺::ura4⁺ars1 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺AT2/rhp7⁺::ura4⁺AT2 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺C5/rhp7⁺::ura4⁺C5 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺R3/rhp7⁺::ura4⁺R3 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ Δrec12::KanMX4/Δrec12::KanMX4 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ rhp7⁺::ura4⁺ars1/rhp7⁺::ura4⁺ars1 Δrec12::KanMX4/Δrec12::KanMX4 pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ mbs1::ura4⁺/mbs1::ura4⁺ pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ 1034::ura4⁺/1034::ura4⁺ pat1-114/pat1-114 ura4-D300/ura4-D300 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ mbs1::C5/mbs1::C5 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*
- *h⁻/h⁻ mbs1::R3/mbs1::R3 pat1-114/pat1-114 leu1-32/leu1-32 ade6M210/ade6M216*

Medios de cultivo:

La composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo ha sido descrita por [Moreno et al \(1991\)](#).

Las cepas utilizadas crecieron en medio rico (YES) o en medio mínimo (MM) a 32°C o 25°C. En los casos de cepas con alguna auxotrofia, el MM se suplementó con 225mg/L de los aminoácidos necesarios.

1.2 BACTERIAS

La cepa de *Escherichia coli* utilizada para la clonación de fragmentos de DNA fue la estirpe DH5 α que posee las siguientes características genéticas: supE44 DlacU 169 (F80 lacZ DM15) hsdR17 recA endA gyrA96 thi-1 relA1.

E. coli creció a 37°C en los medios y condiciones descritos por [Sambrook et al \(1989\)](#).

2. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS

2.1 TRANSFORMACIÓN DE *E. coli*

La transformación de *E. coli* se realizó siguiendo el procedimiento descrito por [Kushner \(1978\)](#).

2.2 TRANSFORMACIÓN DE *S. pombe*

Las cepas utilizadas en este trabajo se generaron mediante recombinación homóloga. Las moléculas lineales se integraron en el genoma de la levadura por estar flanqueadas por casetes de recombinación de 200 a 500 pares de bases de homología con el *locus* genómico elegido.

La transformación de *S. pombe* se realizó mediante la técnica de acetato de litio ([Norbury & Moreno, 1997](#)).

Se transformaron 5×10^8 células creciendo en medio rico en fase exponencial y tras la transformación las células se incubaron toda la noche en agitación en medio no selectivo y al día siguiente se plaquearon en medio selectivo. Cuando se integró el gen *ura4*⁺ como marcador, se seleccionaron las células en MM. En algunas cepas se sustituyó este marcador por otra región en una segunda transformación, en este caso se utilizó MM suplementado con 225 mg/L de uracilo y 1g/L de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) ya que este compuesto es tóxico para las células que mantienen íntegra la ruta de síntesis del uracilo. Cuando alguna de las cepas era auxótrofa además para los aminoácidos leucina o adenina, se suplementaron las placas de transformación con 225 mg/L del aminoácido correspondiente.

Para la delección del gen *rec12*⁺ se utilizó el gen marcador *kan*⁺ que permite seleccionar las células en medio rico suplementado con el antibiótico geneticina (100 mg/L). En este caso las células se recuperaron toda la noche en placas de medio rico y al día siguiente se hicieron réplicas en medio rico con el antibiótico.

3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DE DNA

3.1 AISLAMIENTO DE DNA PLASMÍDICO DE *E. coli*

Para aislar DNA plasmídico a pequeña escala a partir de *E. coli* se empleó el método de la lisis alcalina descrito por [Birnboim & Doly \(1979\)](#). Para la obtención de DNA plasmídico a gran escala se usó el kit Wizard Plus Midipreps de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.2 AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO DE *S. pombe*

La extracción de DNA genómico de *S. pombe* se realizó siguiendo el protocolo descrito por [Moreno et al \(1991\)](#), excepto en las preparaciones de DNA para geles bidimensionales o en bloques de agarosa que se describen en los apartados 7 y 8 de Materiales y métodos respectivamente.

3.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

La purificación de fragmentos específicos de DNA a partir de geles de agarosa se realizó por escisión de la banda de agarosa que contenía el fragmento de interés. A continuación el DNA se purificó utilizando el kit GFX PCR de GE Healthcare siguiendo las especificaciones del fabricante.

3.4 LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Las moléculas recombinantes se obtuvieron mediante la ligación de fragmentos de DNA purificados con un vector plasmídico. Cuando los dos extremos del vector eran compatibles se eliminaron los grupos fosfato de los extremos 5' del DNA con fosfatasa alcalina (Roche) para evitar su ligación. Cuando fue necesario rellenar los extremos 5' protuberantes o eliminar los extremos 3' para hacerlos romos, se utilizó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Fermentas). En la reacción de ligación se utilizó la DNA ligasa del fago T4 (Fermentas).

4. FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Este procedimiento permite obtener células diploides a partir de haploides estériles o del mismo tipo sexual. Durante el proceso la pared celular se degradó enzimáticamente y la fusión celular fue favorecida por la adición de polietilenglicol. Las células se mantuvieron en presencia de estabilizadores osmóticos como KCl o sorbitol y los diploides se seleccionaron por complementación de la auxotrofia para la adenina, ya que los haploides que se fusionaron tenían siempre uno la mutación *ade6-M210* y otro la mutación complementaria *ade6-M216*.

Se partió en todos los casos de 10^8 células de cada uno de los haploides creciendo en medio rico y en fase exponencial. Se centrifugaron los cultivos a 3000 rpm 5 min en un rotor oscilante J6-MC (Beckman) y se resuspendieron en 0.6 ml de 0.65 M KCl con 5 mg/mL de una mezcla de enzimas líticas (SIGMA). Se incubaron a 25°C 25 min y se comprobó la formación de protoplastos en el microscopio. Se elevó el volumen de las muestras a 1.5 ml con TS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M sorbitol) y se centrifugó a 2000 rpm 5 min en una centrífuga de mesa, este proceso se repitió dos veces. A continuación se resuspendieron las muestras en 200 μ l de TCS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl_2) y se mezclaron 50 μ l de la cepa A y 50 μ l de la cepa B utilizando 100 μ l de cada cepa como control. Se incubó a temperatura ambiente 15 minutos y se añadió 1 ml de PEG (20% PEG, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM CaCl_2). Se incubó de nuevo a temperatura ambiente 15 minutos y se centrifugó tres veces a 1500 rpm 2 min 30 seg. Se resuspendieron los precipitados en 200 μ l 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl_2 , 0.5 mg/ml extracto de levadura y 5 mg/ml del aminoácido correspondiente. Se plaqueó en MM + 1.2 M sorbitol y 225 mg/l del aminoácido correspondiente. Se incubaron las placas durante una semana y se comprobó por citometría de flujo que las colonias aisladas eran diploides.

5. SINCRONIZACIÓN DE CULTIVOS EN MEIOSIS

La cepa de *S. pombe pat1-114* descrita por Iino & Yamamoto (1985) tiene el gen de la kinasa Pat1 regulado por un promotor termosensible que permite la inactivación del gen a la temperatura restrictiva, 34°C. La inactivación de la kinasa provoca la activación de *mei2⁺* y el desencadenamiento de una meiosis sincrónica en el cultivo.

Las células crecieron en medio rico a 25°C hasta una A_{595} = 0.4 - 0.8, se lavaron los cultivos dos veces con agua y se resuspendieron en MM + leucina 100 μ g/ml a A_{595} = 0.016. Crecieron 24h a 25°C. Se lavaron dos veces con agua y se resuspendieron en MM sin NH_4Cl (fuente de nitrógeno) + 1% glucosa + leucina 50 μ g/ml a A_{595} = 0.250 y se dejaron en agitación a 25°C durante 12 - 14 h para parar las células en G1. A continuación se añadieron NH_4Cl 0.5 g/L y leucina 50 μ g/ml y se cambió la temperatura de incubación a 34°C para la inducción de la meiosis sincrónica.

6. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se recogieron 10^7 células de cada muestra a analizar y se lavaron con agua estéril tras centrifugar 2 min a 3000 rpm en una centrífuga de mesa. Se resuspendieron en 1 ml de etanol 70% frío y se conservaron a 4°C. Para su procesamiento se trataron 300 µl de cada muestra, se lavaron 2 veces con 1 ml de citrato sódico 50 mM y se resuspendieron en 500 µl de citrato sódico 50 mM con 300 µg RNAsa A (Roche), se incubaron a 37°C 2 horas. A continuación se centrifugaron 2 min a 3000 rpm, se resuspendieron en 0.5 ml de citrato sódico 50 mM y se tiñeron con 2 µg/ml de yoduro de propidio. Posteriormente se sonicaron las muestras durante 20 seg a una amplitud del 40% en un sonicador Labsonic M (Sartorius Stedim Biotech). Finalmente se midieron el tamaño y la fluorescencia de las células en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSort. Para el análisis de los datos se utilizó el programa CellQuest v.3.3 (Becton Dickinson).

7. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL DE INTERMEDIARIOS DE REPLICACIÓN EN GELES DE AGAROSA

7.1 PURIFICACIÓN DEL DNA

El método de extracción del DNA utilizado está basado en las condiciones descritas por [Huberman et al \(1987\)](#). Para cada electroforesis bidimensional se empleó el DNA obtenido a partir de medio litro de cultivo de *S. pombe* a una $A_{595} = 0.8$. Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica adecuada (en el caso de cultivos creciendo en ciclo vegetativo) o se encontraba en el momento deseado de una meiosis sincrónica, se detuvo el crecimiento añadiendo azida sódica a una concentración final de 0.1% y se mantuvo en hielo durante 20 min. A continuación las células se recogieron por centrifugación en un rotor Sorvall GSA a 3000 rpm 5 min. El precipitado de células se lavó con agua estéril a 4°C y se resuspendió en NIB a 4°C (17% glicerol, 50 mM MOPS, 150 mM acetato potásico, 2 mM $MgCl_2$, 500 µM espermidina, 150 µM espermina, pH 7.2) a una concentración de $1.5 - 2 \times 10^9$ células/ml. Para digerir la pared celular se añadieron 15 mg de zimoliasa 20T y se incubó a 37°C 20 min. La lisis de las paredes celulares se comprobó por microscopía óptica. A continuación se produjo la lisis celular diluyendo las preparaciones con 4 volúmenes de agua y los núcleos se recogieron por centrifugación durante 15 min a 3000 rpm en un rotor J6-MC. Los núcleos se resuspendieron en tampón TEN (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) a una concentración de $1.5 - 2 \times 10^9$ núcleos/ml y se incubaron a 37°C durante una hora en presencia de proteinasa K (300 µg/ml) y N-laurilsarcosil al 1.5%. Tras la lisis nuclear, se centrifugaron las muestras nuevamente durante 8 min a 3500 rpm en un rotor J6-MC para sedimentar los restos celulares. Al sobrenadante se le añadieron 1.05 gr/ml de CsCl y 0.025 volúmenes de una solución de Hoescht

33258 a 5 mg/ml en agua. La mezcla se transfirió a tubos de sellado rápido de 11 ml y por último se sometieron las muestras a una ultracentrifugación durante 20 horas a 55000 rpm a 20°C en un rotor vertical 70.1 Ti. Tras la centrifugación se expuso el tubo del gradiente a luz ultravioleta de 280 nm y la banda de DNA genómico se extrajo del tubo del gradiente mediante una jeringa de 1.20 x 40 mm, se eliminó el colorante mediante una solución 5:1 isopropanol : agua y se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 70% a temperatura ambiente.

7.2 CONDICIONES DE ELECTROFORESIS

La electroforesis bidimensional se llevó a cabo adaptando las condiciones descritas por [Brewer & Fangman \(1987\)](#). Una vez purificado el DNA, se digirió con los enzimas de restricción apropiados, de manera que el fragmento analizado tuviera un tamaño entre 3 y 6 kb. La primera dimensión se llevó a cabo en agarosa al 0.4% en el tampón TBE (0.9M Tris-Borato, 0.02M EDTA) a temperatura ambiente y voltaje 0.6 V/cm durante 40 horas. La segunda dimensión se llevó a cabo a 4°C en un gel de agarosa al 1% con 0.5 mg/ml de bromuro de etidio en tampón TBE durante 7 horas a 5 V/cm.

8. OBTENCIÓN DE DNA EN BLOQUES DE AGAROSA

8.1 PURIFICACIÓN DE DNA EMBEBIDO EN BLOQUES DE AGAROSA

Habitualmente se utilizaron 10^8 células/*plug*. El cultivo se incubó 10 min en hielo antes de centrifugarlo a 3000 rpm 5 min en un rotor oscilante de Beckman J6-MC. Las células se lavaron con EDTA 50 mM y se incubaron 30 min a 37°C con 1 mg de zimoliasa 20T en 2 ml de solución Zymo (Na_2HPO_4 40 mM, ácido cítrico 20 mM, sorbitol 0.9 M, EDTA 5 mM, pH 6). Tras comprobar la lisis en el microscopio óptico, cada muestra se centrifugó 2 min a 2000 rpm en una centrífuga de mesa en alícuotas de 1 ml para recoger los protoplastos. Cada muestra se resuspendió en 50 μl de solución Zymo y se incubó en un baño de agua 5 min a 37°C. A continuación se mezcló cada muestra con el mismo volumen de agarosa 1% de bajo punto de fusión. Se cargó en un molde de 100 μl de Bio-Rad y se dejó solidificar 15 min a 4°C. Los bloques se eyectaron a tubos de 10 ml y se incubaron en 1 ml de NDS (EDTA 50 mM, sarcosilo 1%, Tris 10 mM pH 9.5) con 0.5 mg/ml de proteinasa K a 50°C de 12 a 14 horas. Al día siguiente se añadieron otra vez 0.5 mg/ml de proteinasa K y se incubó 4 horas más. Para retirar la proteinasa se incubó cada *plug* en 1 ml de TE con 1 mM PMSF de 2 a 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente se dializaron los *plugs* tres veces 20 min en EDTA 50 mM y se conservaron hasta su uso en esa solución a 4°C.

8.2 DIGESTIÓN Y ELECTROFORESIS DE DNA EMBEBIDO EN BLOQUES DE AGAROSA

Antes de su digestión con enzimas de restricción, cada *plug* se dializó en 3 ml de TE a 4°C en agitación durante 6 periodos de 30 min. Se retiró esa solución y se incubaron en 1 ml de buffer de restricción 1x, 30 min a 4°C. Se retiró el tampón anterior y se añadió la mezcla de digestión. Tras la incubación el tiempo adecuado a 37°C, se dializaron los *plugs* en TAE a 4°C media hora.

La electroforesis se llevó a cabo en un gel de 1% agarosa sin bromuro de etidio con TAE como buffer de electroforesis.

9. SOUTHERN BLOT

Tras la electroforesis del DNA en gel de agarosa, el DNA se depurinizó incubando el gel durante 10 min en HCl 0.125 N. A continuación, se desnaturalizó el DNA en una solución de NaCl 1.5M y NaOH 0.5 M durante 30 min. El DNA fue transferido a una membrana de nylon Hybond-XL (GE Healthcare) mediante el sistema de vacío Vacugene XL (GE Healthcare) a una presión de 60 milibares durante 2 horas usando NaCl 1.5 M / NaOH 0.5 M como solución de transferencia. Una vez terminada la transferencia, la membrana se neutralizó 30 min en 2x SSC (3M NaCl, 0.3M citrato sódico).

Antes de su hibridación con una sonda radiactiva se prehibridó la membrana durante 2 horas a 65°C en 8 ml de 2x SSPE (20x SSPE: 3.6 M NaCl, 0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O, 20 mM EDTA), 1% SDS, 0.5% BLOTTO (10% leche en polvo, 0.2% azida sódica), 0.5 mg/ml DNA de esperma de salmón sonificado (Roche) previamente desnaturalizado. A continuación se sustituyó la solución anterior por 8 ml de la solución de hibridación, con el mismo contenido que la solución de prehibridación más 10% Dextran Sulfato (Sigma) y la sonda radiactiva. Las sondas se prepararon utilizando el sistema de marcaje Ready-to-Go (GE Healthcare) que contiene el fragmento *Klenow* de la DNA polimerasa I de *E. coli*, dATP, dGTP, dTTP y una mezcla de nonanucleótidos que anillan al azar sobre el DNA y sirven de cebadores para la síntesis. Siguiendo el protocolo del fabricante, se marcaron 25 ng de DNA diluido en 45 µl de TE que se desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 5 min y enfriamiento rápido en hielo otros 5 min antes de mezclarlo con el contenido liofilizado del tubo de reacción. Se añadieron 50 µCi de [32P]-α-dCTP y se incubó a 37°C durante 30 minutos. Para eliminar los nucleótidos no incorporados, la sonda se purificó mediante columnas *ProbeQuant G-50* (GE Healthcare). La hibridación se llevó a cabo durante 12 - 14 horas. A continuación se eliminó la sonda y se realizaron dos lavados de la membrana, el primer lavado con una solución que contiene 2x SSPE pH 7.4 (15 mM NaCl, 1 mM NaH₂PO₄ y 0.1 mM EDTA), 0.1% SDS durante 10 minutos a 65°C y el siguiente durante 30 min a 65°C con 0.1x SSPE, 0.1% SDS.

Finalmente, las membranas se envolvieron en plástico y la señal radiactiva se capturó en pantallas radiosensibles (BAS-IP MS2040; Fujifilm) que se escanearon en un sistema *Personal Molecular Imager* (Bio-Rad). Las imágenes se analizaron con el programa QuantityOne v4.2.1 (Bio-Rad). A continuación se expuso la membrana a una temperatura de -80°C durante el tiempo necesario según la intensidad de la señal en una película de autorradiografía BioMax XAR (Kodak).

Bell SP, Dutta A (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374

Bergerat A, de Massy B, Gadelle D, Varoutas PC, Nicolas A, Forterre P (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**(6623): 414-417

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-1523

Borde V, Goldman AS, Lichten M (2000) Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* **290**(5492): 806-809

Brewer BJ, Fangman WL (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* **51**(3): 463-471

Buhler C, Borde V, Lichten M (2007) Mapping meiotic single-strand DNA reveals a new landscape of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **5**(12): e324

Cervantes MD, Farah JA, Smith GR (2000) Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Mol Cell* **5**(5): 883-888

Clyne RK, Kelly TJ (1995) Genetic analysis of an ARS element from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **14**(24): 6348-6357

Cotobal C, Segurado M, Antequera F (2009) Structural diversity and dynamics of genomic replication origins in *Schizosaccharomyces pombe* (Enviado para publicación)

Cromie GA, Hyppa RW, Cam HP, Farah JA, Grewal SI, Smith GR (2007) A discrete class of intergenic DNA dictates meiotic DNA break hotspots in fission yeast. *PLoS Genet* **3**(8): e141

Cromie GA, Hyppa RW, Taylor AF, Zakharyevich K, Hunter N, Smith GR (2006) Single Holliday junctions are intermediates of meiotic recombination. *Cell* **127**(6): 1167-1178

Cromie GA, Rubio CA, Hyppa RW, Smith GR (2005) A natural meiotic DNA break site in *Schizosaccharomyces pombe* is a hotspot of gene conversion, highly associated with crossing over. *Genetics* **169**(2): 595-605

Chikashige Y, Ding DQ, Imai Y, Yamamoto M, Haraguchi T, Hiraoka Y (1997) Meiotic nuclear reorganization: switching the position of centromeres and telomeres in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **16**(1): 193-202

Chuang RY, Kelly TJ (1999) The fission yeast homologue of Orc4p binds to replication origin DNA via multiple AT-hooks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6): 2656-2661

Davis L, Rozalen AE, Moreno S, Smith GR, Martin-Castellanos C (2008) Rec25 and Rec27, novel linear-element components, link cohesin to meiotic DNA breakage and recombination. *Curr Biol* **18**(11): 849-854

Davis L, Smith GR (2003) Nonrandom homolog segregation at meiosis I in *Schizosaccharomyces pombe* mutants lacking recombination. *Genetics* **163**(3): 857-874

Davis L, Smith GR (2006) The meiotic bouquet promotes homolog interactions and restricts ectopic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **174**(1): 167-177

Delgado S, Gomez M, Bird A, Antequera F (1998) Initiation of DNA replication at CpG islands in mammalian chromosomes. *Embo J* **17**(8): 2426-2435

Diffley JF (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* **14**(18): R778-786

Donovan S, Diffley JF (1996) Replication origins in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **6**(2): 203-207

Dubey DD, Kim SM, Todorov IT, Huberman JA (1996) Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr Biol* **6**(4): 467-473

Dubey DD, Zhu J, Carlson DL, Sharma K, Huberman JA (1994) Three ARS elements contribute to the *ura4* replication origin region in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* **13**(15): 3638-3647

Farah JA, Cromie G, Davis L, Steiner WW, Smith GR (2005) Activation of an alternative, *rec12* (*spo11*)-independent pathway of fission yeast meiotic recombination in the absence of a DNA flap endonuclease. *Genetics* **171**(4): 1499-1511

Forsburg SL, Hodson JA (2000) Mitotic replication initiation proteins are not required for pre-meiotic S phase. *Nat Genet* **25**(3): 263-268

- Fox ME, Yamada T, Ohta K, Smith GR (2000) A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **156**(1): 59-68
- Glynn EF, Megee PC, Yu HG, Mistrot C, Unal E, Koshland DE, DeRisi JL, Gerton JL (2004) Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **2**(9): E259
- Gomez M, Antequera F (1999) Organization of DNA replication origins in the fission yeast genome. *Embo J* **18**(20): 5683-5690
- Gutz H (1971) Site Specific Induction of Gene Conversion in SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE. *Genetics* **69**(3): 317-337
- Hayashi M, Katou Y, Itoh T, Tazumi A, Yamada Y, Takahashi T, Nakagawa T, Shirahige K, Masukata H (2007) Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *Embo J* **26**(5): 1327-1339
- Heichinger C, Penkett CJ, Bahler J, Nurse P (2006) Genome-wide characterization of fission yeast DNA replication origins. *Embo J* **25**(21): 5171-5179
- Henderson KA, Keeney S (2004) Tying synaptonemal complex initiation to the formation and programmed repair of DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4519-4524
- Herbig U, Marlar CA, Fanning E (1999) The Cdc6 nucleotide-binding site regulates its activity in DNA replication in human cells. *Mol Biol Cell* **10**(8): 2631-2645
- Hirota K, Steiner WW, Shibata T, Ohta K (2007) Multiple modes of chromatin configuration at natural meiotic recombination hot spots in fission yeast. *Eukaryot Cell* **6**(11): 2072-2080
- Huberman JA, Spotila LD, Nawotka KA, el-Assouli SM, Davis LR (1987) The in vivo replication origin of the yeast 2 microns plasmid. *Cell* **51**(3): 473-481
- Hyppa RW, Cromie GA, Smith GR (2008) Indistinguishable landscapes of meiotic DNA breaks in rad50+ and rad50S strains of fission yeast revealed by a novel rad50+ recombination intermediate. *PLoS Genet* **4**(11): e1000267
- Iino Y, Hiramane Y, Yamamoto M (1995) The role of cdc2 and other genes in meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **140**(4): 1235-1245

Iino Y, Yamamoto M (1985) Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(8): 2447-2451

Keeney S, Giroux CN, Kleckner N (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**(3): 375-384

Kim SM, Huberman JA (1998) Multiple orientation-dependent, synergistically interacting, similar domains in the ribosomal DNA replication origin of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **18**(12): 7294-7303

Kitajima TS, Kawashima SA, Watanabe Y (2004) The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**(6974): 510-517

Kon N, Krawchuk MD, Warren BG, Smith GR, Wahls WP (1997) Transcription factor Mts1/Mts2 (Atf1/Pcr1, Gad7/Pcr1) activates the M26 meiotic recombination hot-spot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13765-13770

Kong D, DePamphilis ML (2001) Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. *Mol Cell Biol* **21**(23): 8095-8103

Kong D, DePamphilis ML (2002) Site-specific ORC binding, pre-replication complex assembly and DNA synthesis at *Schizosaccharomyces pombe* replication origins. *Embo J* **21**(20): 5567-5576

Kushner, SR (1978) An improve method for transformation *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. In Genetic engineering, (eds H. W. Boyer and S. Nicosia), pp 17-23. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press

Lee DG, Bell SP (1997) Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* **17**(12): 7159-7168

Lee JK, Moon KY, Jiang Y, Hurwitz J (2001) The *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex interacts with multiple AT-rich regions of the replication origin DNA by means of the AT-hook domains of the spOrc4 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13589-13594

Lin Y, Smith GR (1994) Transient, meiosis-induced expression of the *rec6* and *rec12* genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**(3): 769-779

Lindner K, Gregan J, Montgomery S, Kearsey SE (2002) Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication. *Mol Biol Cell* **13**(2): 435-444

Lorenz A, Estreicher A, Kohli J, Loidl J (2006) Meiotic recombination proteins localize to linear elements in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* **115**(4): 330-340

Lorenz A, Wells JL, Pryce DW, Novatchkova M, Eisenhaber F, McFarlane RJ, Loidl J (2004) *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J Cell Sci* **117**(Pt 15): 3343-3351

Ludin K, Mata J, Watt S, Lehmann E, Bahler J, Kohli J (2008) Sites of strong Rec12/Spo11 binding in the fission yeast genome are associated with meiotic recombination and with centromeres. *Chromosoma* **117**(5): 431-444

Martin-Castellanos C, Blanco M, Rozalen AE, Perez-Hidalgo L, Garcia AI, Conde F, Mata J, Ellermeier C, Davis L, San-Segundo P, Smith GR, Moreno S (2005) A large-scale screen in *S. pombe* identifies seven novel genes required for critical meiotic events. *Curr Biol* **15**(22): 2056-2062

Mata J, Lyne R, Burns G, Bahler J (2002) The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat Genet* **32**(1): 143-147

Maundrell K, Hutchison A, Shall S (1988) Sequence analysis of ARS elements in fission yeast. *Embo J* **7**(7): 2203-2209

Moon KY, Kong D, Lee JK, Raychaudhuri S, Hurwitz J (1999) Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12367-12372

Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823

Munz P (1994) An analysis of interference in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **137**(3): 701-707

Murakami H, Nurse P (2001) Regulation of premeiotic S phase and recombination-related double-strand DNA breaks during meiosis in fission yeast. *Nat Genet* **28**(3): 290-293

Nishitani H, Lygerou Z, Nishimoto T, Nurse P (2000) The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**(6778): 625-628

Norbury C, Moreno S (1997) Cloning cell cycle regulatory genes by transcomplementation in yeast. *Methods Enzymol* **283**: 44-59

Ogino K, Hirota K, Matsumoto S, Takeda T, Ohta K, Arai K, Masai H (2006) Hsk1 kinase is required for induction of meiotic dsDNA breaks without involving checkpoint kinases in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(21): 8131-8136

Ogino K, Masai H (2006) Rad3-Cds1 mediates coupling of initiation of meiotic recombination with DNA replication. Mei4-dependent transcription as a potential target of meiotic checkpoint. *J Biol Chem* **281**(3): 1338-1344

Saito TT, Okuzaki D, Nojima H (2006) Mcp5, a meiotic cell cortex protein, is required for nuclear movement mediated by dynein and microtubules in fission yeast. *J Cell Biol* **173**(1): 27-33

Sambrook J, Russel D (2001) Molecular cloning. A laboratory manual: Cold Spring Laboratory Press

Schuchert P, Langsford M, Kaslin E, Kohli J (1991) A specific DNA sequence is required for high frequency of recombination in the ade6 gene of fission yeast. *Embo J* **10**(8): 2157-2163

Segurado M, de Luis A, Antequera F (2003) Genome-wide distribution of DNA replication origins at A+T-rich islands in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO Rep* **4**(11): 1048-1053

Segurado M, Gomez M, Antequera F (2002) Increased recombination intermediates and homologous integration hot spots at DNA replication origins. *Mol Cell* **10**(4): 907-916

Steiner WW, Smith GR (2005a) Natural meiotic recombination hot spots in the *Schizosaccharomyces pombe* genome successfully predicted from the simple sequence motif M26. *Mol Cell Biol* **25**(20): 9054-9062

Steiner WW, Smith GR (2005b) Optimizing the nucleotide sequence of a meiotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **169**(4): 1973-1983

Steiner WW, Steiner EM, Girvin AR, Plewik LE (2009) Novel nucleotide sequence motifs that produce hotspots of meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **182**(2): 459-469

Takahashi T, Ohara E, Nishitani H, Masukata H (2003) Multiple ORC-binding sites are required for efficient MCM loading and origin firing in fission yeast. *Embo J* **22**(4): 964-974

Theis JF, Newlon CS (2001) Two compound replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* contain redundant origin recognition complex binding sites. *Mol Cell Biol* **21**(8): 2790-2801

Vashee S, Cvetic C, Lu W, Simancek P, Kelly TJ, Walter JC (2003) Sequence-independent DNA binding and replication initiation by the human origin recognition complex. *Genes Dev* **17**(15): 1894-1908

Wahls WP, Davidson MK (2008) Low-copy episomal vector pFY20 and high-saturation coverage genomic libraries for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **25**(9): 643-650

Wohlgemuth JG, Bulboaca GH, Moghadam M, Caddle MS, Calos MP (1994) Physical mapping of origins of replication in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **5**(8): 839-849

Yamada T, Mizuno K, Hirota K, Kon N, Wahls WP, Hartsuiker E, Murofushi H, Shibata T, Ohta K (2004) Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *Embo J* **23**(8): 1792-1803

Yamashita A, Yamamoto M (2006) Fission yeast Num1p is a cortical factor anchoring dynein and is essential for the horse-tail nuclear movement during meiotic prophase. *Genetics* **173**(3): 1187-1196

Young JA, Schreckhise RW, Steiner WW, Smith GR (2002) Meiotic recombination remote from prominent DNA break sites in *S. pombe*. *Mol Cell* **9**(2): 253-263

A - Adenina

A₅₉₅ - Absorbancia a 595 nm

ADCR - Remodeladores de la cromatina dependientes de ATP - *ATP dependent chromatin remodeling complexes*

ARS - Secuencia de replicación autónoma - *Autonomous replicating sequence*

ATP - Adenosín trifosfato

Bp - Pares de bases - *Base pairs*

C - Citosina

°C - Centígrado

CDK - Kinasas dependientes de ciclina - *Cyclin dependent kinases*

ChIP - Inmunoprecipitación de cromatina - *Chromatin immunoprecipitation*

Clr - *Cryptic loci regulator*

CRE - *Cyclic AMP response element*

dCTP - Desoxicitidina trifosfato

dNTP - Desoxinucleótido trifosfato

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSB - Rotura de doble cadena - *Double strand break*

EDTA - Ácido etilen diamino tetra acético - *Ethylene diamine tetraacetic acid*

FACS - *Fluorescence activated cell sorting*

FOA - Ácido 5-fluoroorótico - *5-Fluoroorotic acid*

G - Guanina

H - Horas

HJ - Unión de Holliday - *Holliday junction*

HR - Recombinación homóloga - *Homologous recombination*

HU - Hidroxiurea

IGR - Región intergénica - *Intergenic region*

Kb - Kilobase

LinEs - Elementos lineales - *Linear elements*

μCi - Microcurios

μg - Microgramo

μl - Microlitro

μM - Micromolar

M - Molar

Mb - Megabase

Mbs1 - *Meiotic break site I*

MCM - *Minichromosome maintenance*

mg - Miligramo

min - Minutos

ml - Mililitro

mM - Milimolar

MM - Medio mínimo
MRN - Complejo Mre11/Rad50/Nbs1
ng - Nanogramo
NHEJ - Unión de extremos no homólogos - *Non homologous end joining*
nm - Nanómetros
nt - Nucleótidos
OD - Densidad óptica - *Optical density*
ORC - Complejo de reconocimiento del origen - *Origin recognition complex*
ORF - Marco abierto de lectura - *Open reading frame*
ORI - Origen de replicación
Pb - Pares de bases
PCNA - Antígeno nuclear de células proliferantes - *Proliferating cell nuclear antigen*
PCR - Reacción en cadena de la polimerasa - *Polymerase chain reaction*
PEG - Polietilenglicol
pre-RC - Complejo prerreplicativo - *Pre-replicative complex*
RIP - Punto de inicio de la replicación - *Replication initiation point*
RNA - Ácido ribonucleico
rpm - Revoluciones por minuto
RPA - Proteína A de replicación - *Replication protein A*
SC - Complejo sinaptonémico - *Synaptonemal complex*
SDS - Dodecil sulfato sódico - *Sodium dodecyl sulfate*
seg - Segundos
SPB - Cuerpo polar del huso - *Spindle pole body*
SSC - *Saline sodium citrate*
SSPE - NaCl/Fosfato sódico/EDTA
t - Tiempo
T - Timina
TAE - Tris/Acetato/EDTA
TBE - Tris/Borato/EDTA
TE - Tris/EDTA
TEN - Tris/EDTA/NaCl
U - Unidades
UV - Ultravioleta
V - Voltios
WT - Cepa silvestre - *Wild type*
YES - Medio rico - *Yeast extract supplemented*